

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**GÖRÜNTÜ İŞLEME TEKNİĞİ İLE SOLÜSYON YOĞUNLUK
ANALİZİ PROGRAMI GELİŞTİRİLMESİ**

Muhittin AKSOY

Yüksek Lisans Tezi

BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

TEMMUZ 2022

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

GÖRÜNTÜ İŞLEME TEKNİĞİ İLE SOLÜSYON YOĞUNLUK
ANALİZİ PROGRAMI GELİŞTİRİLMESİ

Tez Yazarı
Muhittin AKSOY

Danışman
Doç. Dr. Zafer ÇAMBAY

TEMMUZ 2022
ELAZIĞ

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Başlığı:	Görüntü İşleme Tekniği İle Solüsyon Yoğunluk Analizi Programı Geliştirilmesi
Yazarı:	Muhittin AKSOY
İlk Teslim Tarihi:	03.06.2022
Savunma Tarihi:	01.07.2022

TEZ ONAYI

Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına göre hazırlanan bu tez aşağıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından değerlendirilmiş ve akademik dinleyicilere açık yapılan savunma sonucunda OYBİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Danışman:	Doç. Dr. Zafer ÇAMBAY Fırat Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri MYO	<i>İmza</i> Onayladım
Başkan:	Doç. Dr. Naci Ömer ALAYUNT Siirt Üniversitesi, Tıp Fakültesi	Onayladım
Üye:	Dr. Öğr. Üyesi Neslihan KELEŞTEMUR Fırat Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri MYO	Onayladım

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunun/...../20..... tarihli toplantısında tescillenmiştir.

İmza
Prof. Dr. Kürşat Esat ALYAMAÇ
Enstitü Müdürü

BEYAN

Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım “Görüntü İşleme Tekniğı İle Solüsyon Yoğunluk Analizi Programı Geliştirilmesi ” Başlıklı Yüksek Lisans Tezimin içindeki bütün bilgilerin doğru olduğunu, bilgilerin üretilmesi ve sunulmasında bilimsel etik kurallarına uygun davrandığımı, kullandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi, maddi ve manevi desteğı olan tüm kurum/kuruluş ve kişileri belirttiğimi, burada sunduğum veri ve bilgileri unvan almak amacıyla daha önce hiçbir şekilde kullanmadığımı beyan ederim.

01.07.2022

Muhittin AKSOY



ÖNSÖZ

“Görüntü İşleme Tekniğı İle Solüsyon Yoğunluk Analizi Programı Geliştirilmesi” adlı çalışmamda, sağlık alanında laboratuvar ortamında hazırlanan Elisa plakasının görüntü işleme teknikleri kullanılarak yorumlanması konusunda bilgiler verilmiştir.

Çalışmanın amacı; süregelen mevcut analiz yöntemleri dışında görüntü işleme programı vasıtasıyla alternatif analiz ve sentezleri sunmasıdır.

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesindeki destek ve katkılarından dolayı danışmanım Sayın Doç. Dr. Zafer ÇAMBAY’a teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimine beni teşvik eden Sayın Prof. Dr. Latif ÖZER’e, çalışmalarımın her aşamasında bilgi kaynağı olarak gördüğüm ve görüntüleme analiz programını tedarik etmemi sağlayan Sayın Dr. Serdar TUNCER’e, örneklerin tedarik edilmesi aşamasında sabrını ve o çok değerli deneyimlerini benimle paylaşmaktan çekinmeyen Dicle Üniversitesi Hastaneleri Merkez Laboratuvarı Eliza Birimi’nde görev alan Lab. Tek. Gülsüm YAŞA’ya ve çalışmamı hazırlarken tüm süreçlerde bana yardımcı olan sevgili eşim Dr. Raziye AKSOY’a sonsuz teşekkür ederim.

Muhittin AKSOY

ELAZIĞ, 2022

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖNSÖZ.....	iv
İÇİNDEKİLER	v
ÖZET	vi
ABSTRACT	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ	viii
TABLolar LİSTESİ	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	x
1. GİRİŞ	1
2. GÖRÜNTÜ İŞLEME	3
2.1. Görüntü İşleme Teknikleri.....	3
2.1.1. Görüntünün Modellenmesi.....	4
2.1.2. Görüntünün Yakalanma Aşamaları	5
2.1.3. Görüntü İşleme Algoritması.....	6
2.2. Görüntü İşlemede Temel Kavramlar	7
2.2.1. Piksel.....	7
2.2.2. Işık.....	7
2.2.3. Çözünürlük.....	9
2.2.4. Parlaklık	10
2.3. Gri – Düzey Skala	11
2.4. Kenar Bulma.....	12
2.5. Dijital Görüntü Çeşitleri	13
2.6. Görüntü İşleme İşlem Seviyeleri ve Kullanım Alanları	14
2.7. Sayısal Görüntü İşleme.....	15
3. SOLÜSYON YOĞUNLUK ANALİZİ.....	16
3.1. ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) Metodu.....	16
3.2. ELISA Okuyucu Cihazı.....	17
3.3. Fotometrik Ölçüm Metodu	18
3.4. Görüntü Analiz Programı	19
4. MATERYAL VE METOT	23
4.1. Klasik Yöntemle Analiz	23
4.2. Görüntü İşleme Programıyla Analiz.....	25
5. BULGULAR VE TARTIŞMA (ANALİZ).....	27
6. SONUÇLAR.....	30
ÖNERİLER	31
KAYNAKLAR.....	32
ÖZGEÇMİŞ	

ÖZET

Görüntü İşleme Tekniği İle Solüsyon Yoğunluk Analizi Programı Geliştirilmesi

Muhittin AKSOY

Yüksek Lisans Tezi

FIRAT ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Temmuz 2022, Sayfa: x + 33

Görüntü işleme, bilgisayarlarla bütünleşik olarak birçok endüstriyel uygulamalarda kullanılabilen bilgisayar programıdır. Görüntü işleme bir dizi işlemlerden oluşmaktadır. Bu işlemler görüntünün yakalanması ile başlar, görüntü iyileştirme teknikleriyle analiz öncesi hazırlıklar yapılır ve nesne belirleme işlemleri gerçekleştirilir. Bu çalışmada, laboratuvar ortamlarında hazırlanan Elisa mikro plakasının görüntü işleme teknikleri kullanılarak yorumlanması konusunda bilgiler verilmiştir. Çalışmanın amacı; süregelen mevcut analiz yöntemleri dışında görüntü işleme programı vasıtasıyla alternatif analiz ve sentezleri sunmasıdır. Görüntü analiz programı kullanılarak ilgili örneklerin analizlerinin yapılmasının mevcut tespit yöntemlerine alternatif olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca program sayesinde daha kısa sürede ve daha kesin bilgilere ulaşmanın mümkün olunacağı gösterilmiştir. Preparatların analiz ve sentez aşamalarının sistematik bir şekilde ortaya koyulduğu ve preparatlardan alınan resimlerin analizinin kolayca yapılması, görüntü işleme tekniklerinin günümüz teknoloji dünyasında her alanda olduğu gibi sağlık alanında da oldukça önemli bir yere sahip olduğunu bizlere açıkça göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Görüntü işleme, Elisa mikro plakası, Görüntü analiz programı

ABSTRACT

Developing a Solution Density Analysis Program with Image Processing Technique

Muhittin AKSOY

Master's Thesis

FIRAT UNIVERSITY

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biotechnology

July 2022, Pages: x + 33

Image processing is a computer program that can be used in many industrial applications, integrated with computers. Image processing consists of a series of operations. These processes begin with the capture of the image, pre-analysis preparations are made with image enhancement techniques, and object detection processes are performed. In this study, information is given about the interpretation of the Elisa microplate prepared in laboratory environments using image processing techniques. The aim of the study; It offers alternative analyzes and syntheses through the image processing program, apart from the ongoing existing analysis methods. It is thought that the analysis of the relevant samples using the image analysis program may be an alternative to the existing detection methods. In addition, it has been shown that thanks to the program, it will be possible to reach more precise information in a shorter time. The fact that the analysis and synthesis stages of the preparations are laid out in a systematic way and the pictures taken from the preparations are easily analyzed clearly show us that image processing techniques have a very important place in the field of health, as in every field in today's technology world.

Keywords: Image processing, Elisa microplate, Image Analyse Program

ŞEKİLLER LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Analog sinyal / dijital sinyal dönüşümünün modellenmesi	3
Şekil 2.2. Sayısal Görüntü Temsili ve Eksenleri.....	4
Şekil 2.3. Örnek bir görüntünün örnekleme ve nicemlemesi.	5
Şekil 2.4. Görüntünün optik formda yakalanıp analog forma dönüştürülmesi ve daha sonra dijital forma çevrilmesi işlemi	5
Şekil 2.5. Görüntü İşleme Algoritması	6
Şekil 2.6. Örnek bir dijital görüntü ve belli bir kısmındaki piksellerin büyütülmüş hali	7
Şekil 2.7. Elektromanyetik Spektrum	8
Şekil 2.8. Alan Çözünürlüğü ve Pikselasyon	9
Şekil 2.9. Gri-seviye Renk Çözünürlüğü	10
Şekil 2.10. Koordinat Sistemi üzerinde görüntü	11
Şekil 2.11. Sabit sayıya göre parlaklık ayarı.....	11
Şekil 2.12. On altı bitlik gri-düzey skala ifadesi.....	12
Şekil 2.13. Kenar tipleri, (a) Adım (b) Rampa (c) Darbe (d) Çatı	12
Şekil 2.14. Dijital Görüntü Türleri.....	13
Şekil 2.15. Sayısal Görüntü İşleme Aşamaları.....	15
Şekil 3.1. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	16
Şekil 3.2. Spektrofotometre Çalışma Prensibi	19
Şekil 3.3. Görüntünün gama değerine göre gri-skala değişimi	20
Şekil 4.1. Analizi yapılan 96-well plate örneği.....	23
Şekil 4.2. Görüntü İşleme Programı Analiz Ekranı	25
Şekil 4.3. Görüntü işleme programı genel akış şeması	26
Şekil 5.1. Örnek rainbow renk paletli görüntü	28
Şekil 5.2. Örnek greyscale görüntü	28

TABLÖLAR LİSTESİ

	Sayfa
Tablo 2.1. Görüntü işleme işlem seviyeleri ve kullanım alanları.....	14
Tablo 4.1. Numunelerin Optik Dansite (OD) değerleri-I.....	24
Tablo 4.2. Numunelerin Optik Dansite (OD) değerleri-II.....	24
Tablo 4.3. Numunelerin Optik Dansite (OD) değerleri-III	24
Tablo 5.1. Kuyucukların Yoğunluk (piksel sayısı) değerleri	27
Tablo 5.2. Kalibratör ve Kontrollerin OD / Yoğunluk Değerleri.....	29



SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

λ	: Dalga Boyu
f	: Frekans
g/v	: Ağırlık / Hacim
Hz	: Hertz
m	: Metre
m/s	: Metre/Saniye
ml	: Mililitre
NxM	: Satır x Sütun
v	: Hız

Kısaltmalar

2D	: İki Boyutlu
A	: Abzorbans
AIDS	: Acquired Immune Deficiency Syndrome (Kazanılmış Bağışıklık Yetersizliği Sendromu)
AVG	: Average
CCD	: Dijital kameralarda bulunan görüntü sensörü (Charge Coupled Device).
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
ELISA	: Enzyme Linked Immunosorbent Assay
GAU	: Gauss
HBsAg	: Hepatitis B surface antigen (Hepatit B yüzey antijeni)
HIV	: Human Immunodeficiency Virus
IgA	: İmmünoglobulin A
IgG	: Geç cevap antikoru (İmmünglobülin G)
LOG	: Logaritmik
MED	: Median
OD	: Optik Dansite
pH	: Bir çözeltinin asitlik ve bazlık derecesini tarif eden ölçü birimi (Power of Hydrogen).
RNA	: Ribo Nükleik Asit
ROI	: Region of Interest
TBBA	: Topolojik Bağımsız Bileşen Analizi
UV	: Ultraviyole
V-F	: Viande Foie

1. GİRİŞ

Görüntü işlemenin başlıca amacı; bozuk, eski ve gürültülü görüntüleri iyileştirmek, görünmesi zor ve tespit edilmesi gereken nesneleri keskinleştirme ve gözlemlenmedir. Gezegen ve yıldız fotoğraflarını ilgi çekici hale getirmek için daha yüksek çözünürlüğe ulaştırma; araç plakası gibi desenleri tanıma; araba, insan, ağaç, silah gibi nesne ve objeleri ayırt etme gibi ihtiyaçlar görüntü işleme tekniklerinin neden bu kadar önemli olduğunu önümüze sermektedir.

Teknolojik gelişmelerin artışının bir sonucu olarak, görüntü işleme yöntemleri hayatımızın içerisine daha sık ve hızlı bir şekilde girmiştir. Görüntü işlemenin sırrı, birçok işlemin insan gücü yerine otomatik sistemler tarafından yapılabilmesinde saklıdır. Daha önceleri bir araştırmacının kullanmış olduğu görüntü analiz-sentez programları yetersiz kaldığı için görüntü üzerinde çok kısıtlı iyileştirme değişiklikleri yapılmaktaydı. Ayrıca yapılmakta olan bu değişiklikler de yapılması planlanan görüntü işleme çalışmalarına fazla ışık tutamamaktaydı. Şimdilerde ilerlemiş olan teknolojiler sayesinde Ar-Ge çalışmaları görüntü işleme programları ve teknikleri sayesinde oldukça kolaylaşmış ve yaygınlaşmıştır.

Her sistemin belirli zaman periyotları ve dönemlerinde bakım-onarım ve kalibrasyon işlemlerinin gerçekleştirilmesi gerekmektedir. Bu işlemler kurulmuş olan sistemin işleyişinin aksamaması için önem arz etmektedir. Fotometrik ölçüm tekniği kullanan cihazlar da bakım-onarım sürecine tabi tutulmaktadır. Dolayısıyla bu süreç tamamlanana kadar cihazların test sonucu verememesi nedeniyle bilimsel ve akademik çalışmaların kesintiye uğrama durumu söz konusudur. Ayrıca bu tür test ve analiz cihazlarının maliyetleri de oldukça yüksektir. Her kurumun bu sistemleri sahip olamaması da sorunlardan bir tanesidir. Bu cihazlara sahip olmayan kurumlardaki numunelerin taşıma aracılığıyla cihaza sahip kurumlara nakli, ekonomik olarak yük ve kaynak kullanımı olarak olumsuz etkiler getirmektedir. Cihaza numuneler yüklendikten sonra ve cihaz test aşamasında iken, cihazın arızalanması ya da test sürecinin herhangi bir nedenle kesintiye uğraması sonucunda her çalışma için kullanılmak zorunda olunan numune ve maliyetli test kitleri ziyan olmaktadır.

Metot olarak; fotometrik ölçüm ile ELISA yönteminde kullanılan mikro plakalarda oluşan solüsyonların renklerinin analizini ölçen cihazların verdiği sonuçlar ile görüntü işleme metoduyla aynı solüsyonların görüntülerinin analizini yapan programın tespit ettiği sonuçlar arasında yakın bir ilişki olduğu saptandı. Fotometrik yöntemle solüsyonların abzorban ölçümü yapılırken görüntü işleme programıyla solüsyon resimlerinin gri-skala renk düzeylerinin ölçümü yapıldı. Alınan her iki sonucun birbirine yakınlığı tespit edildi.

Literatürde sağlık alanında bu çalışmayla benzerlik gösteren fazla araştırma bulunmamaktadır. Genellikle görüntü işleme farklı bilim dallarındaki araştırmalarda kullanılmıştır. Elisa görüntü işleme araştırmalarının en günceli 2021 yılında Koekoeh Santoso ve arkadaşları

tarafından makale haline getirilmiştir ve bu çalışmada Santos; elisa plakalarının görüntüsünü masaüstü tarayıcı kullanarak almış ve görüntü işleme sonucunda çıkan sonuçların ELISA okuyucusundan alınan sonuçlara göre yakın bir okumaya sahip olduğunu göstermiştir [1]. Richard C. Murdock ve arkadaşları tarafından araştırılan makalede; dijital kamera veya kamera kadar etkin Windows veya Android tabanlı tabletler kullanarak, kağıt tabanlı ELISA'ları (P-ELISA'lar) görüntüleyip, MATLAB ile görüntü analizi gerçekleştirip ve hedef biyomolekül konsantrasyonuyla yüksek korelasyonlu yanıt eğrileri üretmişlerdir [2]. Ayrıca Douglas J. Soldat ve arkadaşları da 2009 yılında yayınladıkları makalelerinde; taranan bir mikropkaka görüntüsünün dijital görüntü analizinin, birkaç yaygın kantitatif mikro ölçekli prosedür için bir spektrofotometrenin yerini alabileceğini gösteriyorlar [3].

Erkan Türker ve arkadaşlarının çalışmaları; ortalama boncuk çapı, boncuk sayısı, birim alana düşen boncuk sayısı gibi sayısal verilerle daha objektif değerlendirme yapabilen bir bilgisayar programı geliştirilmiştir [4]. Jesper Ø. Hjortdal ve arkadaşlarının çalışmaları; korneanın in vitro biyomekanik çalışmaları için dijital görüntü işlemeyi yararlı bulmuşlardır [5]. Federica Zanca ve arkadaşlarının makalelerinde ise; görüntü işlemenin dijital mamogramlarda mikrokalsifikasyonların tespiti üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğunu göstermişlerdir [6].

Bu çalışmada, fotometrik ölçüm yapan cihazlardan elde edilen sonuçlara alternatif olarak bir başka tespit-analiz sistemini oluşturarak bilimsel ve akademik çalışmaların kesintiye uğramadan devam etmesini sağlamak amacıyla daha ekonomik ve daha az kaynak kullanımı gerektiren bir yapı kurmayı amaçlanmaktadır. Bunun için de fotometrik ölçüm yöntemine alternatif olarak, görüntü işleme tekniklerinin kullanılabilirliği hedeflenmiştir.

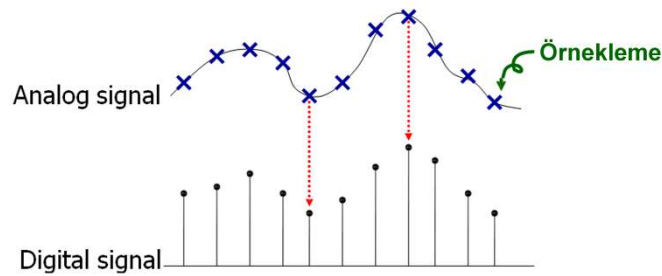
Kullanılan bu yöntem sayesinde teknolojiye erişimi kısıtlı olan işletmelerin daha hızlı ve ekonomik bir şekilde çalışmalarının sonuçlandırılmasına katkıda bulunulmuştur.

2. GÖRÜNTÜ İŞLEME

Görüntü işleme, birçok teknolojik alanda (robotik, trafik, endüstri, tıp, askeri, coğrafya) kullanılmaktadır. Ayrıca görüntülerin işlenmesini takiben çok sayıda algoritma üretilmesine olanak sağlamaktadır. Birçok bilim dalında sıklıkla kullanılan görüntü işleme kavramının; öncelikli olarak hangi teknikler kullanılarak yapıldığına değinmek oldukça faydalı olacaktır.

2.1. Görüntü İşleme Teknikleri

İki boyutlu ışık şiddeti fonksiyonu olan görüntü fonksiyonu, $f(x, y)$ şeklinde gösterilir. Buradaki x ve y değerleri kartezyen koordinatlarını, $f(x, y)$ fonksiyonunun değeri ise parlaklık ya da görüntünün (x, y) noktasındaki gri seviye değerini göstermektedir [7]. Üç boyutlu nesnelerin yüzey üzerine düşürülerek iki boyutlu piksel dizi haritası oluşturulduğumuzda aslında görüntüyü elde etmiş oluyoruz. Yeni oluşturulan 2 boyutlu görüntüdeki her noktanın renk ve konum bilgisi ($f(x, y)$) bu haritanın içerisinde bulunmaktadır. Bu harita henüz sinyal halindedir ve gerekli işlemler sonucu insan gözünün görebileceği şekilde biçimlendirilmesi işlemi sonucu Resim kavramına ulaşırız. Görüntünün 2 temel unsuru mevcuttur. Bunlardan birisi Analog, diğeri Dijitaldir. Görüntüyü oluşturan $f(x, y)$ fonksiyonundaki her x değişkenine karşılık gelen y değişkeni bir reel değeri gösteriyorsa bu görüntüye Analog görüntü denilmektedir. Bu da fonksiyonun her noktada sürekli olduğu anlamına gelmektedir. Bunun sonucu olarak da Analog bir görüntünün mikron düzeyde yakınlştırılması sonucunda bile üzerinde bulunan renklerin kaybolmadığını görürüz. Dijital görüntü kavramının gerekliliğinin en önemli nedenlerinden birisi; analog görüntü gibi sürekli fonksiyonların sayısallaştırılmamış olduklarından dolayı sayısal bilgisayarlar tarafından analiz edilememesidir. Sonuç olarak; $f(x, y)$ şeklinde gösterilmiş olan sürekli görüntünün (analog görüntü), $f[x, y]$ şeklinde gösterilen dijital görüntüye dönüştürülmesi için ayırık modeller tipinde (discrete) ifade edilmesi Şekil 2.1’de gösterilmiştir. [8].



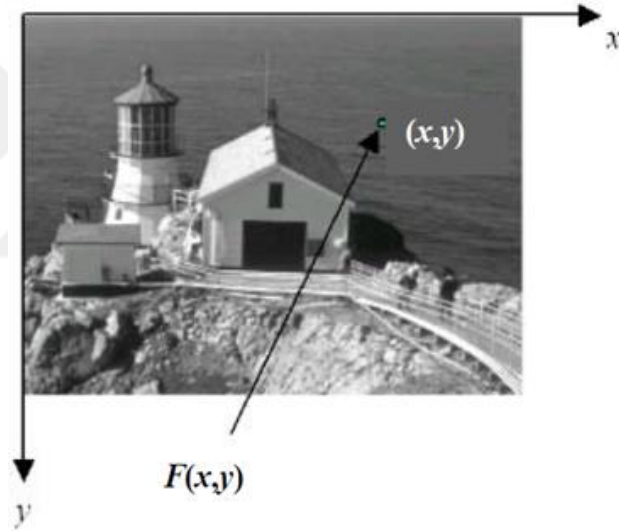
Şekil 2.1. Analog sinyal / dijital sinyal dönüşümünün modellenmesi

2.1.1. Görüntünün Modellenmesi

Sayısal görüntü matris şeklinde tanımlandığında; matrisin içerisindeki her bir satır ve sütun indisleri aslında görüntünün herhangi bir noktasını tanımlamaktadır. Dolayısıyla bu görüntünün her bir noktasındaki gri seviye değeri, matrisin her bir indisinin sayısal değerine eşit olmaktadır. Ortaya çıkan pikseller ya da görüntü elemanları, oluşturulan sayısal dizinin (matrisin) her bir elemanını işaret etmektedir [9].

$f(x, y)$ görüntü fonksiyonunun uzaysal koordinatlar ve genlik olarak sayısallaştırılması sonucunda, bu fonksiyon sayısal bilgisayarlar da işlenmeye uygun hale gelir. Örnekleme; kartezyen uzaysal koordinatların sayısallaştırılması, niceleme ise genliğin sayısallaştırılması olarak adlandırılmaktadır (Shanon'un Örnekleme ve Niceleme Teoremi) [10].

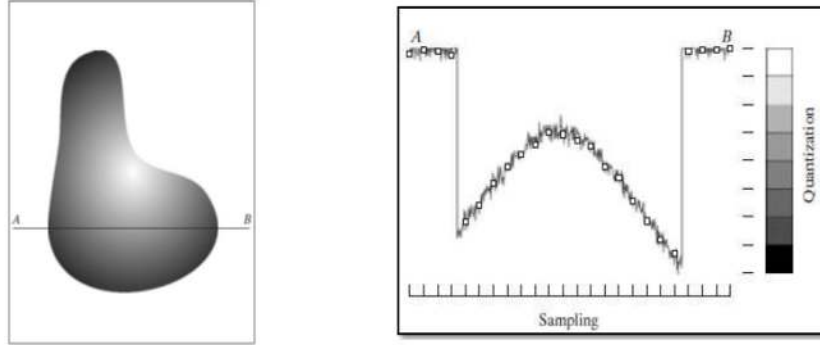
Şekil 2.2'de gösterilen bir resim; $f(x, y)$ fonksiyonunun örnekleme ve niceleme işlemleri sonucu sayısallaştırılması gösterilmiştir.



Şekil 2.2. Sayısal Görüntü Temsili ve Eksenleri

Görüntü elde etmek, dijital görüntü işleminin birinci safhası olarak belirtilebilir. Dijital görüntü işleme için ilk önce sensörlerden gelen görüntü bilgisayara aktarılır. Daha sonra görüntü üzerinde bir dizi işlem yapılır ve sonunda görüntüleyici veriyi çıkışa iletir. Görüntü kaynağının yapısına bağlı olarak görüntünün elde edilmesi için kullanılan yazılım ve donanımlar farklılık gösterebilir. Örneğin; CCD kameralar (CCD ve kızılötesi (IF)), X-Ray cihazları, ultrason cihazları, Manyetik Rezonans (MR) görüntüleme sistemleri ve uydu gibi kaynaklar, evrendeki üç boyutlu nesnelerin dijital görüntülere dönüştürülmesini sağlayan sistemlerdir. Görüntüleme sensörünün çıkışı, uzaysal davranışı ve genliği, görüntülenen nesneye bağlı olarak değişen sürekli bir voltaj dalgasıdır. Örnekleme ve niceme işlemleri; sensörün çıkışında elde edilecek bu sürekli veri olan

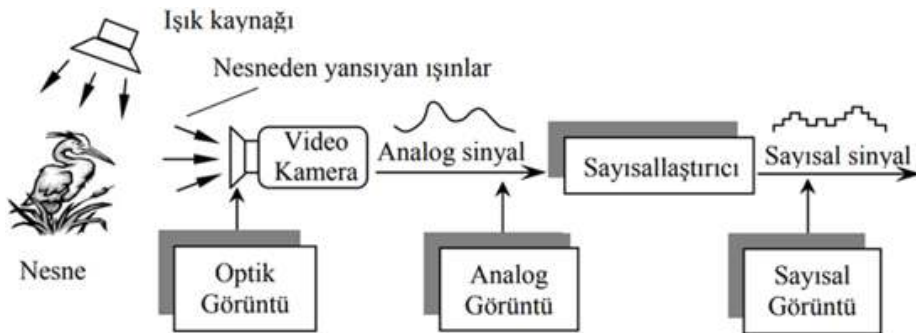
dijital görüntünün dijitize edilmesi için kullanılmaktadırlar. Elde edilen $f(x, y)$ görüntü fonksiyonu koordinatlarda ve genlikte sürekli olabilir. Şekil 2.3’de dijital görüntü elde etmek için hem koordinat değerleri (Örnekleme) hem de genlik değerleri dijitize edilmiştir (Nicemleme). [11].



Şekil 2.3. Örnek bir görüntünün örnekleme ve nicemlemesi.

2.1.2. Görüntünün Yakalanma Aşamaları

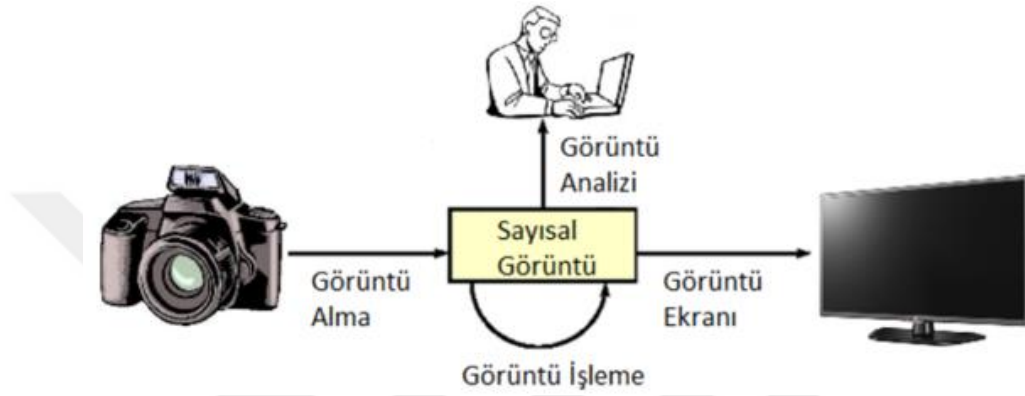
Resimsel bilgilerin seçilme, eklenme, çıkarılma gibi işlemlere tabi tutularak değiştirilmesi ve analiz edilmesine görüntü işleme denilmektedir [12]. Bu analizlerde takip edilen birinci aşama, görüntü yakalama (image acquisition) işlemidir. Şekil 2.4.’de görüntü yakalama işleminin aşamaları şematik olarak gösterilmiştir. Buradaki nesne bir ışık kaynağı yardımıyla aydınlatılmıştır. Video kamera nesneden yansıyan optik formdaki ışınları algılamaktadır. Kamera, nesnenin optik formda tanımlandığı bu ışınları elektrik sinyallerine dönüştürmektedir. Bu işlemden sonra görüntünün formatı analoga çevrilmiş olur. Sayısal dönüştürücü yardımıyla analog sinyaller sayısal sinyallere dönüştürülmektedir. Son işlem olarak sayısal dönüştürücü yardımıyla sayısal sinyallere dönüştürmüş olan görüntü, işlenmek üzere bilgisayar ortamına aktarılır. Bu işlemler için öncelikle görüntü sensörüne (Imaging Sensor) ihtiyaç vardır. Sensörün üretmiş olduğu analog sinyalleri dijital forma dönüştürebilecek sistemler analog/dijital dönüştürücüler içermektedirler [13].



Şekil 2.4. Görüntünün optik formda yakalanıp analog forma dönüştürülmesi ve daha sonra dijital forma çevrilmesi işlemi.

2.1.3. Görüntü İşleme Algoritması

Bilgisayar ve yazılımlar yardımıyla elektronik ortamda bulunan işlenmeye hazır halde bulunan sayısal görüntü verilerinin amaca uygun şekilde değiştirmeye yönelik yapılan çalışmalara görüntü işleme denilmektedir. Görüntü analizi ise Görüntülerden ulaşılan istatistiksel analizlere uygun sayısal veriler elde etmeye de görüntü analizi denilmektedir ve Şekil 2.5’de bu süreç gösterilmektedir [14].



Şekil 2.5. Görüntü İşleme Algoritması

Resimsel bilginin doğal yapısını değiştirerek, görüntüyü yorumlayabilmek için geliştirilmesi veya çeşitli görüntüleme sistemlerinde kullanılmak üzere daha kullanışlı biçime dönüştürme sürecine görüntü işleme denilebilir. Düşük kaliteli (gürültülü, bulanık, vs.) resimlerin kalitesinin artırılması ve içerisinde bulunan nesnelerin sınırlarının tespit edilmesi de görüntü işleme teknikleri ile sağlanabilir [14].

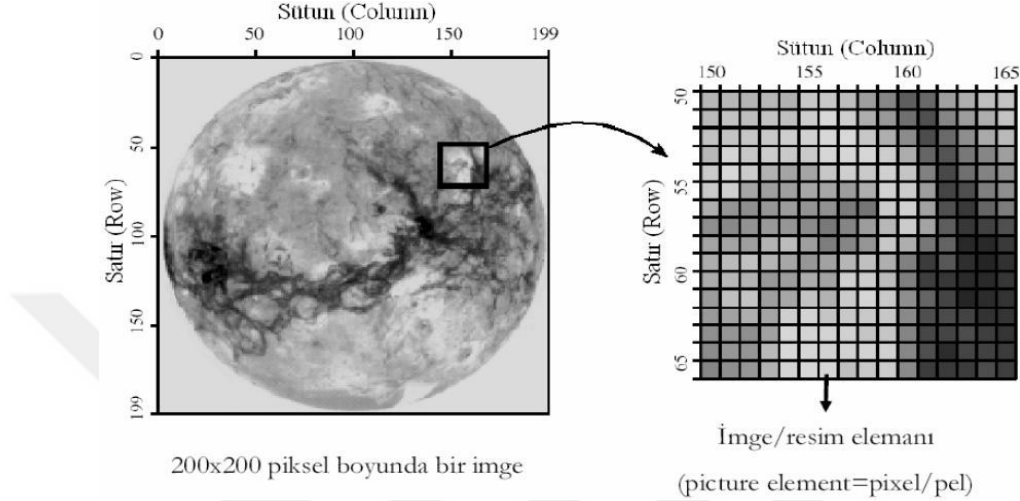
İki ya da üç boyutlu görüntülerin işleme ve analiz edilmesi aşamasında kullanılan teknikler arasında; nesneleri tanıma ya da ayırma, sınırlarının netleştirilmesi ve çizilmesi, nesnelerin istatistiklerinin alınması, görüntünün kalitesinin iyileştirilmesi, resim tipinin değiştirilmesi, ortaya çıkan histogramın eşitlenmesi, resim gürültüsünün giderilmesi ya da resme gürültü eklenmesi, resmin maskeleymesi, filtrelenmesi, ölçeklendirilmesi, yönlendirilmesi, yansıtılması ve renginin düzeltilmesi yer almaktadır [15].

Görüntü işlemede farklı amaçlar için kullanılan yöntemler bulunmaktadır. Bu yöntemler vasıtasıyla oluşturulan çeşitli algoritmalar mevcuttur. Yöntemler ve algoritmalar aynı isimlendirilmelerle kullanılmaktadır. Örnek vermek gerekirse; Gabor Süzgeç Metodu, Histogram Eşitleme, Fourier Dönüşüm Metodu, Dalgacık Dönüşümü Metodu, Topolojik Bağımsız Bileşen Analizi (TBBA), Medyan (Orta) Filtreleri, vb. [16].

2.2. Görüntü İşlemede Temel Kavramlar

Görüntü işlemede temel olarak 4 adet kavramdan bahsedilebilir.

2.2.1. Piksel



Şekil 2.6. Örnek bir dijital görüntü ve belli bir kısmındaki piksellerin büyütülmüş hali

Şekil 2.6’da esas yapısı gösterilen bir dijital görüntü bulunmaktadır. Bu görüntüde satır ve sütun indisleri matris biçiminde gösterilmiştir. Oluşturulmuş olan bu matrisin her bir elemanı görüntü içerisinde herhangi bir noktayı tanımlamak için kullanılmıştır. Ayrıca bu noktaların rengi hakkında bilgi sahibi olmak için matrisin her bir elemanının barındırdığı dijital değerlere başvurulmaktadır. Sonuç olarak bu dijital matris dizisinde bulunan her bir elemana görüntü elemanı veya piksel denilmektedir [11].

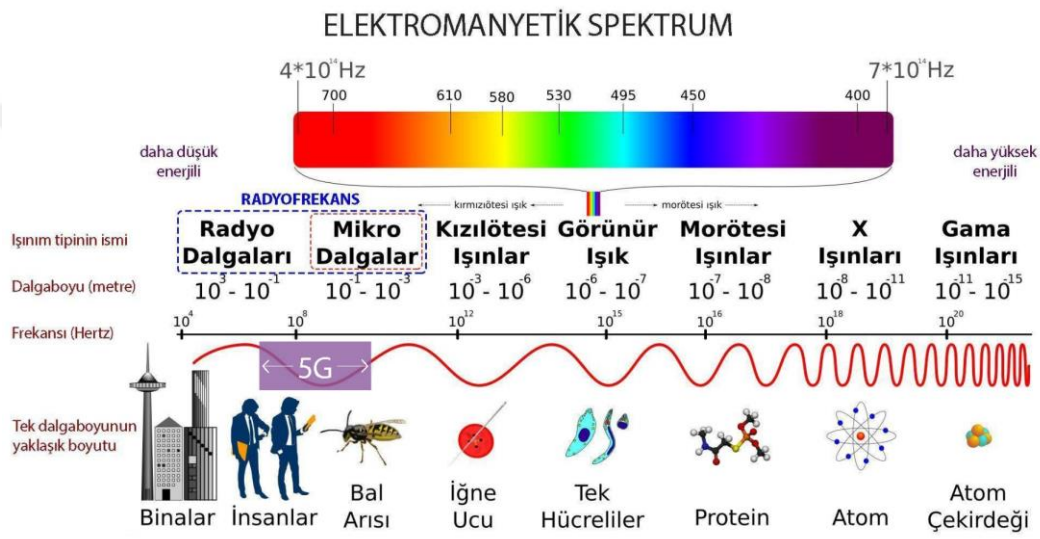
Bir resimde; f şiddet birimi (parlaklık gibi), x ve y değişkenleri ise görüntünün gerçek koordinatları olmak üzere tanımlanan $f(x, y)$ fonksiyonu, gerçek yaşamda bir görüntünün basit iki değişkenli bir fonksiyonu olarak tanımlanır [17].

2.2.2. Işık

Enerji (dalga) ve madde (kütle) olduğu ispatlanan ışık hakkında birçok teoriler mevcuttur. Işık kaynağı tarafından yayılan ve radyasyon enerjisi şeklinde olan küçük ışık dalgacıkları, çevreye düz çizgiler halinde yayılırlar. Elektromanyetik spektrumda çok küçük bir aralıkta bulunan görünen ışık ancak %2’lik kısma tekabül etmektedir. İnsanlar bu küçük aralığın dışındaki ışık dalgalarını çıplak gözle görememektedirler. [8].

Genel olarak görünen ışığın dalga boyu 370 – 760 nanometre (0,38 – 0,76 mikron) aralığındadır ve bu bölgede bulunan her bir rengin kendine ait bir dalga boyu vardır. Işığın hızını saniyede 300 bin km'dir ve c harfi ile gösterilir. $c = v \cdot \lambda$ bağıntısına göre ışık, hem birimi Hertz olan frekansa (ν) hem de birimi Metre olan dalga boyu (λ) değerlerine bağlıdır ve boşlukta 299.792.458 m/s hıza sahiptir [8].

Şekil 2.7'deki elektromanyetik spektrum incelendiğinde beyaz ışığın renklerine ayrıştırılmasından bir renk bandının oluştuğunu gözlemlemekteyiz. Bu renk bandı da bizlere dalga boyu büyüdükçe rengin mordan kırmızıya doğru dönüşmekte olduğunu göstermektedir.



Şekil 2.7. Elektromanyetik Spektrum

Siyah bir cisim üstüne düşen bütün ışığı emdiği için infrared (kızıl ötesi) ve ultraviyole (mor ötesi) ışınlar gibi bütününüyle görünmez. Ayrıca bir cisim ısıtıldığı zaman kademeli olarak sadece belirli renklerde ve frekanslarda ışıma yapar ve bu ışımlar oldukça sınırlıdır. Bu kademeler incelendiği zaman ısıtılan cisim önce kızılötesi, sonra ısındıkça kırmızı ve sonuçta beyaz renge sahip olur. Cisim yeteri kadar ısıtılabilseydi mavi renge dönüşüp en sıcak yıldızlar gibi ultraviyole ışınlar saçabilirdi.

Gündelik hayatımızda ışığın dalgaboyunu değiştirmenin ya da gözle görülmeyen frekansını görünür hale çevirmenin birçok faydası bulunmaktadır. Flüoresan(fosforlu) maddelerin özelliği, kendilerine gönderilen değişik frekanslardaki görünür bölge dışındaki ışıkları alıp bunları daha farklı frekanslarda yayabilip yansımalarının daha parlak olmasıdır. Örnek vermek gerekirse; reklam panolarında kullanılan flüoresan boya ve mürekkepler, çamaşırları daha parlak göstermek için kullanılan UV ışığı mavi ışığa çeviren optik parlaticı temizleme tozları, paraların kontrolünde; paranın üzerine nüfus ettirilen boyanın geri yansıtılması için kullanılan ışık kaynağı [8].

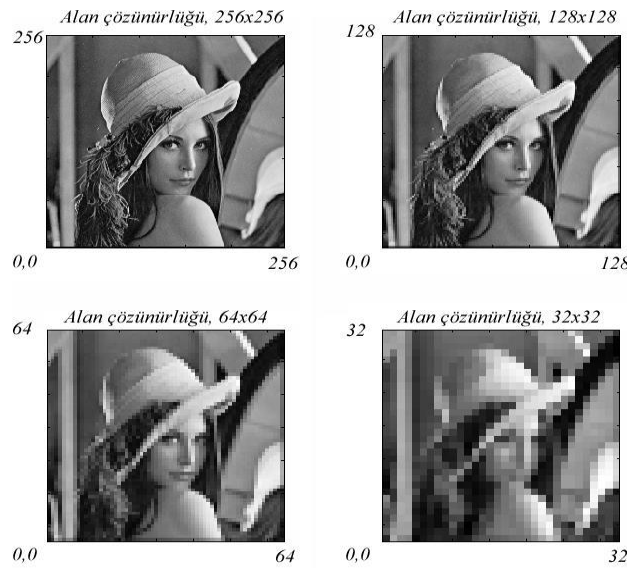
2.2.3. Çözünürlük

Bir görüntü ya da resimdeki yatay piksel sayısı ve dikey piksel sayısının kartezyen çarpımına çözünürlük denilmektedir [11]. Pikseller için boyut kavramından bahsedemediğimiz için çözünürlük görüntünün ebatlarıyla ilgili bilgi içermemektedir. Fakat mevcut görüntüdeki piksel sayısı azaldıkça ya da başka bir deyişle görüntünün çözünürlüğü düştükçe görüntüdeki pikselasyon artar.

Bir görüntü içerisindeki ayrıntıların fark edilebilme derecesi, o görüntünün çözünürlüğü ile alakalıdır. Tam bu noktada Alan çözünürlüğü ve Parlaklık çözünürlüğü kavramlarından bahsedebiliriz. Alan çözünürlüğü görüntü yüzeyinin herhangi bir yerinden alınan örnek sayısıdır ($N \times M$). Parlaklık çözünürlüğü de pikselin üzerinde bulunan rengin gri seviye karşılığı olarak parlaklığını belirtir. Bu iki kavramın değerlerindeki artış ne kadar fazla olursa sayısallaştırılmış görüntünün orijinaline yaklaşması o oranda olur ve görüntünün kapladığı bellek alanı da hızlı bir şekilde artar.

Sayısal görüntüyü elde etmek amacıyla kullanılan Alan hassaslığı, analog görüntünün yatay/dikey taranması esnasında toplanan örnek sayısı ile ilgilidir. Analog görüntüye ya da orijinal görüntüye yaklaşabilmek için sayısal görüntüyü oluşturan piksellerin sayısının ($N \times M$) fazlalaşması gerekmektedir. Tam tersi durumda, görüntü içerisindeki ayrıntıların kaybolması ve uzaysal çözünürlüğünün düşmesi ancak piksellerin sayısının azaltılmasıyla sağlanabilir. Bu duruma dama tahtası etkisi (checkerboard effect) adı verilmektedir ve görüntü içerisinde yapay karelerin oluşması ile sonuçlanmaktadır.

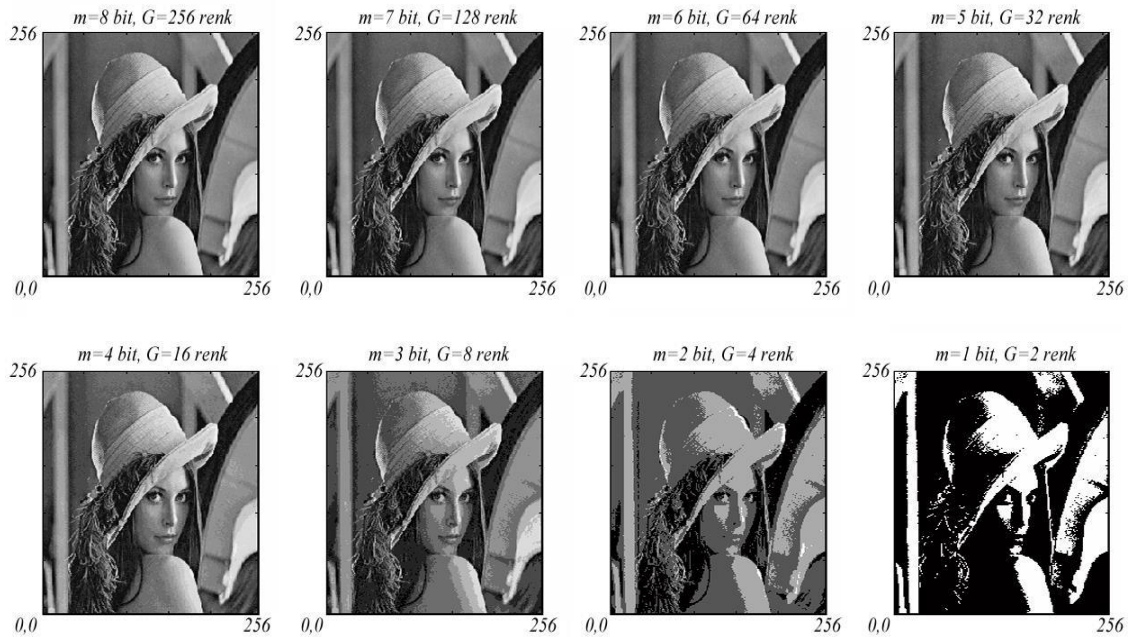
Şekil 2.8’de çeşitli alan çözünürlüğüne sahip 4 adet 8 bit gri-ton görüntü verilmiştir. Resimden de anlaşılacağı gibi piksel sayısı azalması, dama tahtası etkisini artırmıştır [8].



Şekil 2.8. Alan Çözünürlüğü ve Pikselasyon

Siyah renkten beyaz renge doğru rengin parlaklığının 256 (8 bit) adımda artması gri seviye skalası olarak adlandırılır. Gri seviye skalasında her bir pikselin parlaklığına karşılık gelen sayı parlaklık hassaslığı kavramını ortaya çıkarmıştır. Bu skaladaki her bir gri renk, herhangi bir rengin karşılığı olan parlaklığı göstermektedir. Uygulamalarda yaygın olarak kullanılan gri-ton görüntülerde beyaz rengin gri seviye anlamında parlaklık değeri 255'dir. Yani, gri-ton görüntülerin piksellerinin her biri $m=8$ bit ile temsil edilir ve gri seviye aralığında olmak üzere 256 farklı değer alabilir ($G = \{0, 1, 2, \dots, 255\}$). Gri seviyelerin sayısının azalmasının sonucu olarak, görüntü içerisinde yapay çizgisel hatlar ortaya çıkmaya başlamaktadır.

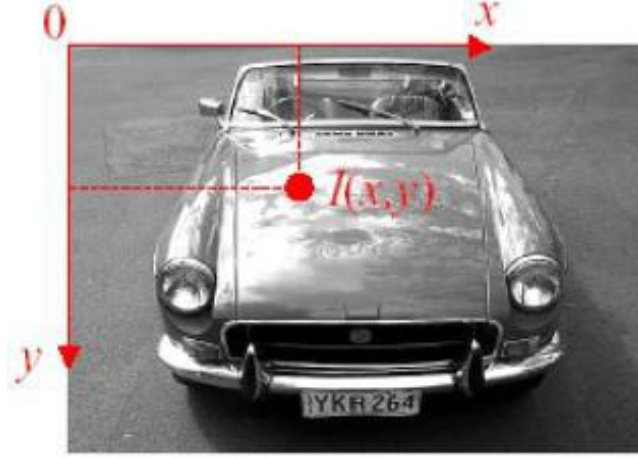
Şekil 2.9'da 2^n formülünde n =bit sayısı olmak üzere; 256 renk (8-bit), 128 renk (7-bit), 64 renk (6-bit), 32 renk (5-bit), 16 renk (4-bit), 8 renk (3-bit), 4 renk (2-bit) ve 2 renk (1-bit) olan aynı alan çözünürlüğüne sahip ($N \times M = 256 \times 256$) gri-ton görüntüler verilmiştir. Bu görüntüler incelendiğinde; 8 bit ile 5 bit arasındaki farklar resmin gri-ton olmasından da kaynaklı olmak üzere çıplak gözle tam olarak anlaşılamamaktadır. Ancak 4 bit ile 1 bit arasında resim kalitesinin düştüğünü çok net bir şekilde görebilmekte ve yapay sınırları fark edebilmekteyiz [8].



Şekil 2.9. Gri-seviye Renk Çözünürlüğü

2.2.4. Parlaklık

Şekil 2.10'da x ve y uzaysal boyutlar olmak üzere; x - y koordinatlarındaki pikselin değeri $I(x, y)$ fonksiyonu ile gösterilmektedir [18].



Şekil 2.10. Koordinat Sistemi üzerinde görüntü

Görüntünün genel görünümüyle ilgili iki adet özellikten bahsedebiliriz. Görüntünün gri değerlerinin ağırlıklı ortalaması görüntünün parlaklığının ve varyans da görüntünün kontrastının bir ölçüsüdür. Şekil 2.11’de gösterildiği gibi, görüntünün piksellerinin gri değerlerine sabit bir sayı eklenerek ya da çıkartılarak aynı görüntünün parlaklığını ayarlayabiliriz [19].

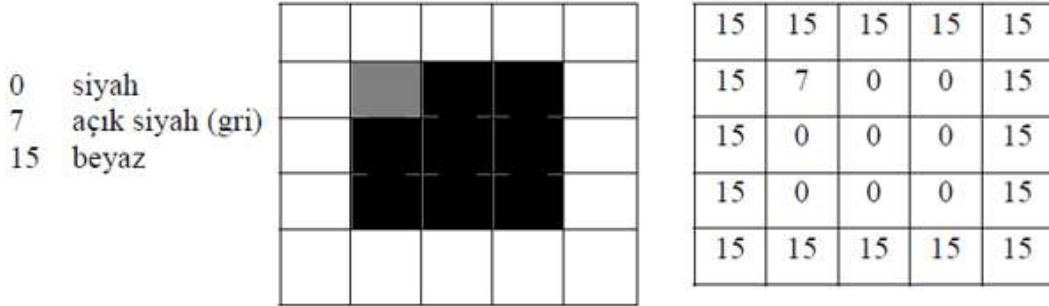


Şekil 2.11. Sabit sayıya göre parlaklık ayarı

2.3. Gri – Düzey Skala

Görüntü üzerindeki piksel düzeylerinin farklı olmasından dolayı aydınlatma değerleri de farklı seviyelerde olmaktadır. Böyle durumlarda görüntü üzerindeki her bir noktaya denk gelen pikselin gri-düzey skala üzerindeki renk değerleri, görüntünün siyah-beyaz renk tonlarından meydana gelmesine sebep olur. Şekil 2.12’de görüntü üzerindeki her bir nokta için farklı aydınlatma düzeyi tanımlanmaktadır ve bu parlaklıklar için gerekli bitlerin yerleşimi de farklılık göstermektedirler [7].

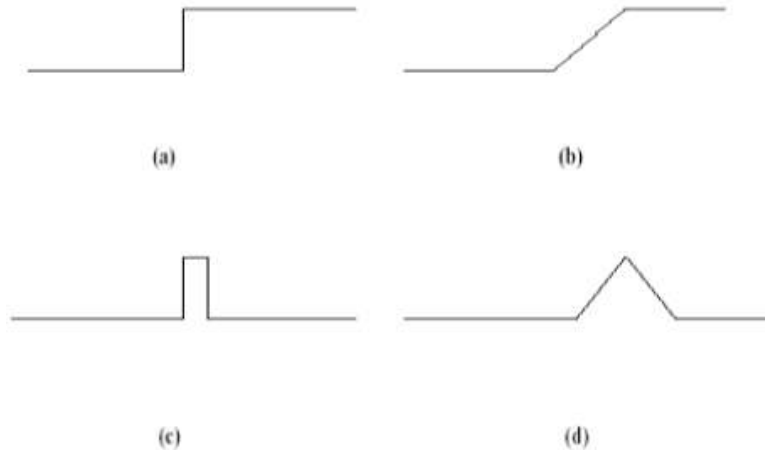
16 farklı gri-ton (4-bit) parlaklık değeri için her bir pikselin üzerinde bulunacak gri-seviye parlaklık değerlerine Şekil 2.12'deki gibi örnek verilebilir.



Şekil 2.12. On altı bitlik gri-düzey skala ifadesi

2.4. Kenar Bulma

Gri tonlu bir örnek resimlerde düşey eksen boyunca örneklerin kenarlarındaki ton değişiminin seviyesi ciddi derecede değişmektedir. Adım-Step fonksiyonu bir kenarın modellenmesinde kullanılan en ideal fonksiyondur. Oysaki analog bir resimde kenara yaklaştıkça ya da kenardan uzaklaştıkça piksel değerlerinin bir anda değil de kademeli olarak değiştiği gözlenmektedir. Bu tür modellemelere rampa şeklinde modelleme denilebilir. Bazı durumlarda da iki adet adım-step ya da rampa kenar birleşerek çatı ya da darbe biçiminde sinyaller türetebilirler[8]. Şekil 2.13'de oluşturulan kenar tipleri verilmiştir.



Şekil 2.13. Kenar tipleri, (a) Adım (b) Rampa (c) Darbe (d) Çatı

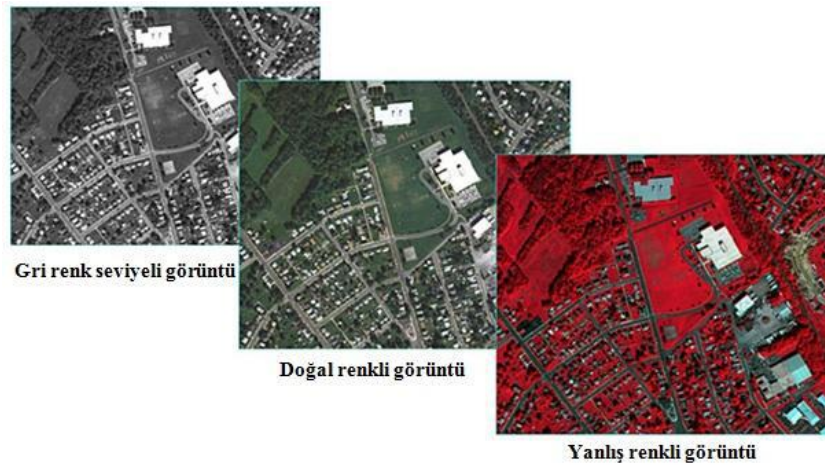
Birçok kenar bulma; filtreleme, türevleme ve kenar bulma algoritmaları diye adlandırılan üç aşamadan oluşur. Resim içerisindeki gürültünün yok edilmesi için belirli süzgeçlerden geçirilmesi

işlemi filtreleme aşamasında gerçekleştirilir. Bu gürültülerin oluşması genelde iki sebepten dolayıdır. Birincisi resim elde ederken kullanılan kameranın ve resmi çekilecek nesnelerin fiziki yapısı; ikincisi örnekleme, quantalama hataları gibi dijital resmin elde edilmesinde kullanılan metotlardır. Resimdeki nesnelerde tespit edilecek olan kenarların yakınındaki bölgelerde, yoğunluk değişimi fazla olduğundan türevleme aşaması diye adlandırılan ikinci aşamada, resimdeki nesnelerin kenar bölgeleri parlak hale getirilir. Son aşamada ise, türevleme aşaması yardımıyla elde edilmiş parlak kenar bölgelerinin kenar resmi elde edilmeye çalışılmaktadır. Başka bir deyişle; kenar bulma algoritması görüntüdeki mevcut her bir pikselin parlaklık değeriyle, etrafındaki diğer piksellerin sahip olduğu parlaklık değerlerinin karşılaştırılması temeline dayanır. Parlaklıklardaki değişim miktarının tespitinden kaynaklı olarak Sobel, Laplace ve Prewit vb. gibi bazı kenar belirleme algoritmaları geliştirilmiştir ve hepsi de aynı algoritma mantığına dayalı olarak çalışmaktadır[20].

2.5. Dijital Görüntü Çeşitleri

Genel olarak dijital görüntüler Şekil 2.14'deki gibi 4 farklı grup altında incelenebilir.

- 1) Binari Görüntü: Siyah ve beyaz, 0 veya 1 olmak üzere 2 değer alırlar.
- 2) Gri Renk Seviyeli Görüntü: Renk bilgisi içermeyen ve sadece parlaklık bilgisi içeren tek renkli görüntülerdir.
- 3) Renkli Görüntü: 24 bitlik veri olarak bilgisayar ekranlarında görüntülenirler. Görüntüleme RGB (R(Kırmızı), G(Yeşil), B(Mavi)) olmak üzere; aynı objeye ait üç adet gri seviyeli görüntünün kodlanarak üst üste ekrana iletilmesi ile oluşur.
- 4) Çok Spektrumlu Görüntü: Görünür spektrumun dışındaki bölgelerden alınan ve yanlış renkli görüntü olarak da adlandırılan görüntülerdir.



Şekil 2.14. Dijital Görüntü Türleri

2.6. Görüntü İşleme İşlem Seviyeleri ve Kullanım Alanları

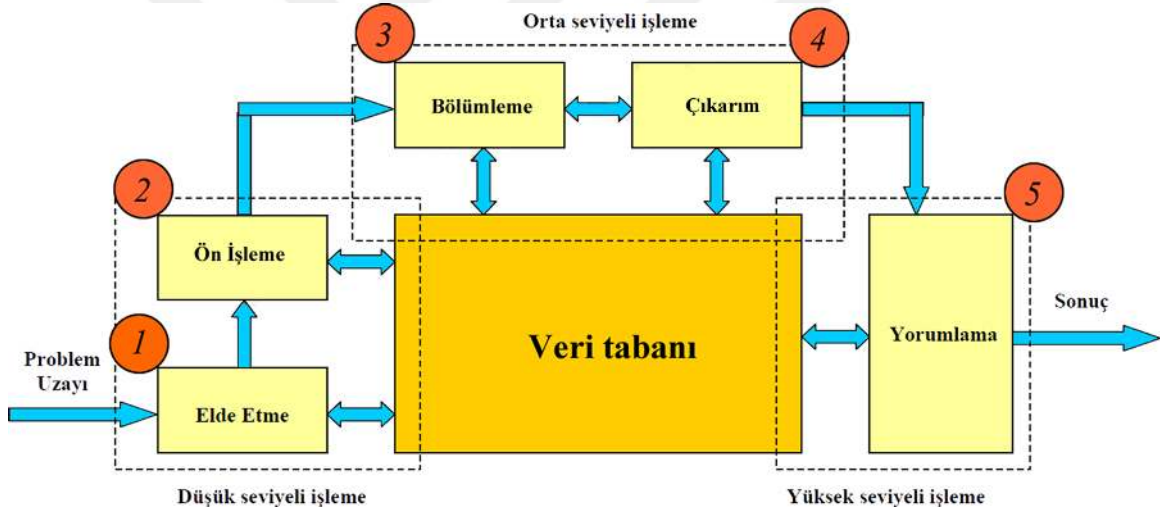
Görüntüden elde edilecek verilerin çeşitliliğine göre mevcut görüntüler işlenirken, kullanılan işlemler farklılıklar göstermektedir. Görüntülere uygulanan ön hazırlık evresi ile görüntülerin üzerindeki gürültü (görüntü bulanıklığı, netlik, kötü görüntü) azaltılıp görüntü işlemeye hazır hale getirilir. Daha sonraki işlemler ise sırasıyla; görüntü inceleme, nesne tanıma ve yorumlama basamaklarıdır. Bu basamaklarda için görüntülere düşük, orta ve yüksek seviyede işlemler uygulanmaktadır. Düşük seviye işlemlerde; görüntüye filtreler uygulanarak, görüntünün iyileştirilmesi amaçlanmaktadır. Orta seviyedeki işlemlerde; bölümlendirme ve tanımlama işlemleri kullanılarak bilgisayar işlemleri için görüntülerdeki nesnelerin tanınması ve sınıflandırılması yapılmaktadır. Yüksek seviye işlemlerde; görüntülerdeki nesneler tanındıktan sonra, görüntülerin analiz edilmesi ve yorumlanması işlemlerini kullanmaktadır. Ayrıca görüntünün iyileştirilmesi gerektiğinde; her üç seviye de kullanılabilir. Bir görüntüye sadece orta ve yüksek seviye işlemler ancak görüntünün kaliteli ve yüksek çözünürlüklü cihazlar ile elde edilmesiyle uygulanabilmektedir [21]. Tablo 2.1’de görüntü işleme teknikleri kullanılarak elde edilmiş görüntülerin işlem seviyeleri, kullanım amaç ve alanları ile görüntülerin renk biçimleri hakkında bilgiler verilmiştir.

Tablo 2.1. Görüntü işleme işlem seviyeleri ve kullanım alanları

Kullanım Alanları	Kullanım Amacı	İşlem Seviyesi	Görüntü Renk Biçimi
Tasarım ve İmalat Uygulamaları	Üretim süreci ürün tespiti Üç boyutlu yorumlama Nesne tanıma Ürün ayrıştırma Ürün hasar tespiti Robotik – Otomasyon	Düşük Seviye Orta Seviye Yüksek Seviye	Gri ve Siyah-Beyaz Renkli Renkli ve Siyah-Beyaz
Savunma Sanayi Güvenlik Uygulamaları	Hedef izleme Nesne tanıma Yüz tanıma Görüntü iyileştirme Parmak izi tanıma	Orta Seviye Yüksek Seviye	Renkli ve Gri Gri ve Siyah-Beyaz
Tıp Alanında Görüntülerin İncelenmesi	Görüntü iyileştirme (Mikroskopik) Görüntü iyileştirme (Kardiyografi) Görüntü iyileştirme (Sintigrafi) Ultrason ve röntgen görüntüleri Ortopedi	Düşük Seviye Orta Seviye Yüksek Seviye	Siyah-Beyaz Renkli Gri Gri ve Negatif Gri ve Siyah-Beyaz
Mimari Uygulamalar	Tarihsel kalıntılara doku giydirme Mimari yapıların yeniden modellenmesi	Düşük Seviye Orta Seviye Yüksek Seviye	Renkli
Harita ve Jeodezi Uygulamaları	Uzaktan algılama	Orta Seviye Yüksek Seviye	Renkli ve Gri
Gıda Uygulamaları	Gıda sınıflandırma Besin alan tespiti	Orta Seviye Yüksek Seviye	Renkli ve Gri

2.7. Sayısal Görüntü İşleme

Görüntü işleme sinyal işlemeyle karıştırılmamalıdır. Sinyal işlemede, veriler alınıp ölçme ve değerlendirme işlemine tabi tutulur. Daha sonra, diğer bir cihazda analiz edilebilir bir biçime dönüştürülür ya da bir elektronik ortamdan başka bir elektronik ortama aktarılmasına yönelik işlemler yapılmaktadır [22]. Belirli bir hedefe yönelmiş görüntü kaynağından alınan farklı içerikler görüntüyü oluşturur. Bu tarz görüntülere örnek olarak röntgen, elektro mikroskop, ultrason ve bilgisayar içerikli görüntüler vb. verilebilir. Görüntü üzerindeki gürültüyü (görüntü bulanıklığı, netlik, kötü görüntü) azaltmak için görüntülere uygulanan ön hazırlık evresi görüntü işlemenin kalitesini artırıcı bir özelliğe sahiptir. Bunun içindir ki; görüntülere düşük, orta ve yüksek seviye içeren işlemler uygulanmaktadır. Görüntülerdeki nesnelerin görüntü içeriği detaylandırılması ancak mevcut görüntülerin bilgisayar ortamında analiz edilmesiyle mümkün kılınmaktadır. Görüntü işleme bu detaylandırma aşamaları Şekil 2.15’de verilmiştir [23].



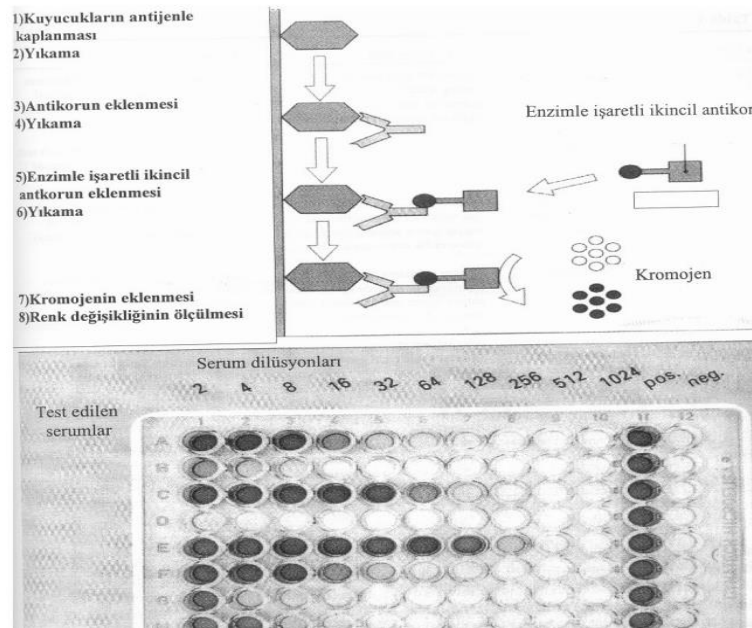
Şekil 2.15. Sayısal Görüntü İşleme Aşamaları

3. SOLÜSYON YOĞUNLUK ANALİZİ

Solüsyonların yoğunluklarının analizlerini yapabilmek için öncelikli olarak preparatların incelenmesi ve bu preparatların hazırlanış aşamalarına bakılması gerekmektedir. Daha sonra hazırlanan bu preparatın günümüzde hangi sistemlerle analiz edildiği önem arz etmektedir. Son olarak da; alternatif görüntü analiz programının incelenmesi faydalı olacaktır.

3.1. ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) Metodu

ELISA, spesifik bir antijen ile bir antikorun reaksiyonu sonucu bazı hastalıkların tanısında kullanılan bir test çeşididir. Yine özel bir enzim kullanılarak testin sonucunu renklendirilir. ELISA testiyle canlı vücudunda oluşmuş olan antikorların tespiti, dolayısıyla bazı enfeksiyon etkenleri belirlenebilmektedir. Test için hastanelerin laboratuvarlarında damardan kan ve bazı vücut sıvısı örnekleri alınıp, alınan kan örneklerinden analiz için serum elde edilir. Son olarak Şekil 3.1.'deki aşamalardan geçmiş olan ve ELISA cihazlarıyla ayrılmış olan serum örneği, hastalığa özgü kitlerle teste tabi tutulur [24]. ELISA testi yardımıyla HIV/AIDS, Kızamık, Kızamıkçık, Kabakulak, Hepatit B gibi birçok enfeksiyon hastalıklarının ya da gebelik tanısı konulabilmektedir. Örneklerde, aranan antijen ve antikora rastlanırsa sonuç pozitif, aksi takdirde sonuç negatiftir. Sonucun pozitif çıkması aktif/önceden geçirilmiş bir enfeksiyon ya da enfeksiyona karşı koruyucu bağışıklık gibi çeşitli anlamlar içermektedir. Sıkça kullanılan Anti-HIV, HBsAg, anti-HBs gibi testlerin sonucu aynı gün, daha az çalışılan bazı testlerin sonuçları da birkaç gün sonra alınabilmektedir[25].



Şekil 3.1. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

ELISA metotlarından birisi olan Endirekt ELISA kısaca şu şekilde açıklanabilir:

Kullanılacak teste göre özel üretilmiş olan mikrolakaların kuyucuklarına bağlanmış özgül antikolar bulunmaktadır. Mikrolakanın içerisine; aranacak materyal (serum) ve mikrolakada mevcut yapışık durumda bulunan antikordan (1. hayvan) farklı yapıda bir antikor (2. Hayvan) karışımı eklenir. Mikrolaka içerisindeki mevcut ve sonradan eklenen antikora bağlanan bir antijen varsa; son aşamada enzime uygun kromojen substrat eklendiğinde kuyucuk içerisinde renklenme oluşur[26-27].

3.2. ELISA Okuyucu Cihazı

Mikrolaka okuyucu, biyolojik araştırma ve gözlemsel çalışmaların çeşitli alanlarında kullanılan önemli bilimsel araçlardan birisidir. Fotometrik mikro plaka okuyucu veya elisa plaka okuyucu olarak da adlandırılabilir. Genellikle araştırma laboratuvarlarında kullanılan Elisa okuyucular ile kanserin tespiti de yapılabilmektedir. Başka bir deyişle, Elisa okuyucuya, gözlemsel çalışmaların sonuçlarını tasarlamak için uyarlanmış özel spektrofotometre de denilmektedir. Plaka okuyucunun mikro kuyularında çeşitli biyolojik örneklerin sonuçlarının okunması, genellikle çalışmaların fiziksel, kimyasal ve biyolojik yönlerinin gözlemleri amacıyla kullanılmaktadır. Araştırmacılar ve bilim adamları mikro kuyularındaki çeşitli örnekleri değerlendirmek için Elisa okuyucu cihazını kullanmaktadırlar.

Tipik bir mikrolaka elisa okuyucu, değerlendirmeler için numune reaksiyonlarını içermek üzere kullanılan yaklaşık 96 kuyuya sahiptir. Mikrolaka okuyucu – elisa plaka okuyucu, doğrudan veya ikincil antikolar kullanılarak katı bir yüzey üzerinde yakalanan bir antijen veya antikoların tespiti için kullanılır. Bu antikolar, antijenin varlığını belirtmek için etiketlenir. Elisa plaka okuyucusunda üretilen reaksiyon hızları spektrofotometreler tarafından okunur ve araştırmada kullanılır. Mikrolakalar, özel spektrofotometreler kullanılarak birçok değerlendirmenin yapıldığı biyolojik araştırmaların temel parçasıdır.

Biyolojik ve bilimsel laboratuvarlarda çok modlu okuyucuların birçok kullanımı vardır. Plaka okuyucunun çok katmanlı kuyularındaki reaksiyonları analiz etmeye yardımcı olurlar. Bu yöntemle, sonuçlar, çıkarılan sonuçların doğrudan okunması tekniğiyle yorumlanabilir. Elisa tekniğinin seroloji ve immünoloji alanlarında doğrudan uygulaması vardır.

Mikrolaka okuyucu tekniği, organizmalarda ve diğer hayvanlarda enfeksiyöz bir ajanın antikolarının ve antijenlerinin varlığını doğrular. Burada bir aşından veya oto-antikorlardan gelen antikolar da tespit edilir.

Bir mikrolaka okuyucunun özel bir spektrofotometre olarak adlandırıldığına inanılmaktadır. İki arasındaki tek fark: geleneksel spektrofotometre ve mikrolaka okuyucusu, mikrolaka okuyucusunda kolorimetrik ajanların bulunmasıdır. Geleneksel spektrofotometrede

çok plakalı okuyucuda bulunmayan geniş bir dalga boyu aralığına bulunmaktadır. Mikroplaka okuyucuda ayrıca sonuçları yorumlamak için kırınım ızgaraları bulunur. Bu durum çeşitli kanser türlerinin tespiti için elisa tekniklerinde daha önemlidir. En iyi mikroplaka okuyucuda dalga boyu aralığı 400-750 nm arasındadır. Bazı mikroplaka okuyucuların analiz için ultraviyole aralığında çalıştığı görülüp, 340 ila 700 nm ışık ışınları arasındaki analizlerde gerçekleştirilir.

Mikroplaka okuyucudaki optik sistem, iyi değerlendirme sonuçları sağlamak için birçok üretici tarafından kullanılmaktadır. Biyolojik örnekleri içeren plaka okuyucu kuyularına ışık ışınları sağlamak için optik fiberler kullanılır. Bu numuneler analiz için mikroplaka okuyucunun farklı kuyularına yerleştirilir. Biyolojik numunelerden geçen ışık ışınları 1 ila 3 mm çap aralığındadır. Örnek reaksiyonlarından gelen ışık ışınlarını algılamak için elisa plaka okuyucuda bir algılama sistemi kullanılır. Bu sistem ayrıca sinyali yükseltir ve reaksiyon örneğinin abzorban oranını belirler. Plaka okuyucularından oluşan bir okuma sistemi, açık ve özlü yorumlama için ışık demetlerini veri setlerine dönüştürür. Biyolojik test numuneleri, hassas bir şekilde tasarlanmış plakalara veya bir mikroplaka okuyucunun kuyularına yerleştirilir. 8 sütuna 12 sıralı mikroplakalar, tipik bir mikro plaka okuyucusunda toplam 96 kuyuya sahiptir. Bu, çok katmanlı bir okuyucudaki ortak kuyu sayısıdır. Bazı plaka okuyucularda, daha fazla reaksiyon örneğini barındırabilen daha fazla sayıda kuyuya sahip plakalar da vardır.

Plaka okuyucuların özel uygulamaları durumunda, kuyu sayısı en üst düzeye (384 oyuklu) çıkarmaktır. Kuyucuklardaki artış, numunelerde kullanılan reaktiflerin sayısını azaltmak için yapılır. Optik sensörlerin mikroplaka okuyucudaki konumu üreticilere bağlı olarak değişir. Bazılarında numune plakasının üzerinde yer alabilir, bazılarında ise dolaylı olarak mikroplaka kuyu bölgelerinin altında olabilir.

Artık son zamanlarda, mikroplaka okuyucular tarafından düzenlenen ve bilgisayar ekranına yerleştirilmiş mikroişlemciler gibi farklı kontrol özellikleri vardır. Bu bağlantı ara yüzleri, mikroplaka okuyucuda kullanılan çeşitli reaksiyon örneklerinden gelen bilgileri değerlendirmek için üretilmiştir. Bu sistemlerde okuyucudaki kalite ve süreç kontrol programları gibi özelliklerin kullanımı kolaydır. Tüm bunlar, mikroplaka okuyucuda tam test otomasyonuna izin veren bir bilgisayar kullanılarak yapılır[28].

3.3. Fotometrik Ölçüm Metodu

Fotometri bir çözelti içindeki maddenin abzorbanasının; ışık kaynağından çıkan ışık miktarı ile mevcut dedektör üzerine düşen ışık miktarının farkı olarak ifade edilebilir. Bu işlem filtreler kullanılarak yapılıyorsa cihaz fotometre adını, yarıklar ya da prizmalar aracılığı ile yapılıyorsa Şekil 3.2'deki gösterildiği gibi spektrofotometre adını almaktadır. Çözelti konsantrasyonunun

belirlenmesi için değeri bilinen bir çözeltinin soğurduğu ışık miktarı ile kendi absorpladığı (optik dansite/OD) ışık miktarının karşılaştırılmasıyla hesaplanır.

Spektrofotometrelerde kullanılacak ışık, çözeltinin kuvvetli soğurduğu dalga boyunda seçilmelidir. Spektrofotometrelerdeki ölçümlerde mevcut örneklerdeki solüsyonların konsantrasyonları bulunur. Bunun için solüsyon içerisindeki maddenin tespitine uygun dalga boyu seçilir. Konsantrasyonu bilinen başka bir örneğin abzorban (A) ya da Optik Dansite (OD)'si ile karşılaştırılıp gerekli matematiksel işlemler yapıldıktan sonra sonuca ulaşılır. Ya da solüsyonların abzorban değerleri, abzorbanı sıfır kabul edilen bir solüsyonun abzorban değeriyle karşılaştırma işlemi yapılır. Bunun için de yine belirli bir dalga boyu seçilir. Her solüsyonun abzorbanı ayrı ayrı ölçülerek sonuçları bir grafik kâğıdına yazılmak suretiyle standart grafiği elde edilir. Sonrasında bu grafik vasıtasıyla solüsyonların abzorbanlarına karşılık gelen sonuç bulunabilir [29].

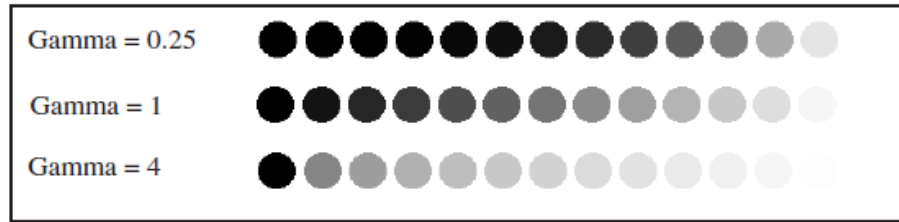


Şekil 3.2. Spektrofotometre Çalışma Prensibi

3.4. Görüntü Analiz Programı

Fotoğraflar, siyahtan beyaza kadar sonsuz sayıda renk tonu ile görüntülenirler. Bu gölgeler kesintisiz olarak sürekli olarak harmanlanır. İnsan gözünün aksine, bir bilgisayar sürekli tonlu görüntüleri yorumlayamaz. Dijital sistemler, bir görüntünün gri tonlamalı bilgilerini sayılara çevirir. Sayısallaştırma işlemi en iyi şekilde görüntünün üzerine görünmez bir ızgara yerleştirmek ve her ızgara konumunda görüntünün parlaklığını, kontrastını ve rengini yorumlamak olarak tanımlanır. Her ızgara konumundan elde edilen sayılar bir piksele atanır. Bir görüntüdeki tüm piksellerden gelen bilgiler, bir piksel matrisi oluşturmak için birlikte gruplandırılır. Oluşturulan bu matris, her pikselin satırını ve sütununu (x, y) tanımlayan koordinat konumunu ve her piksel konumunda parlaklık bilgisi ve yoğunluk bilgisini içermektedir. Carestream MI Yazılımı, diğer

programlara benzer şekilde, bu piksel matrislerini geliştirmek ve işlemek için filtreleme tekniklerini kullanır. Image Display penceresi, sahte renk paleti uygulayarak veya önceden tanımlanmış diğer çeşitli filtreleri uygulayarak görüntünüzün kontrastını ve gamasını ayarlayarak görüntünün görünümünü değiştirmemize olanak tanır. Image Display penceresindeki tüm seçeneklerde olduğu gibi parlaklığı ve kontrastı ayarlamak, görüntü veri bütünlüğünü korurken görsel görüntüyü etkiler. Ayrıca görüntünün gamasını da ayarlayabiliriz. Gama, bir görüntüdeki ilgilenilen ögenin kontrastını azaltarak veya artırarak görüntü görünümünü iyileştirmek için kullanılabilen matematiksel bir dönüşüm işlevidir. Şekil 3.3’de de görüldüğü üzere bir görüntünün gamasını ayarlamak, gri seviye dağılımını orantısız bir şekilde çarpıtır; yüksek gama değerleri görüntüyü aydınlatır ve düşük gama değerleri görüntüyü koyulaştırır.



Şekil 3.3. Görüntünün gama değerine göre gri-skala değişimi

Image Display penceresinde siyah noktayı, beyaz noktayı veya gamayı ayarlamak yalnızca ekrandaki, dışa aktarılan ve yazdırılan görüntüyü etkiler. Bu ayarlar görüntü verilerini etkilemez. Yazılım ayrıca iki temel görüntü filtreleme türü sunar: Tek Piksel Filtreleme ve Komşu Piksel Filtreleme. Bu filtreler, görüntüyü iyileştirmek, belirli bir özelliği geliştirmek veya görüntünün görsel görünümüne özel efektler eklemek için tasarlanmıştır:

Tek Piksel Filtreleme—tek tek pikseller üzerinde matematiksel veya mantıksal bir hesaplama gerçekleştirir ve sonuçta ortaya çıkan değer görüntülenmek üzere görüntüde değiştirilir. Örneğin, Ters Çevir işlemi her pikselin yoğunluk değerlerini tersine çevirir, yani beyazlar siyah olur. Komşu Piksel Filtreleme—piksel grupları üzerinde matematiksel veya mantıksal hesaplamalar yapar. Komşuluk filtreleme, tek noktalı piksel işlemekten farklıdır çünkü filtreleme, her pikseli çevreleyen piksel grubu üzerinde matematiksel hesaplamalar yapmak için bitişik piksellerden gelen bilgileri kullanır. Bir hesaplama dâhil olan piksel sayısı, filtre çekirdeği tarafından tanımlanır. Yazılım bu piksel hesaplamalarını 3 x 3, 5 x 5 veya 7 x 7 komşu piksel grupları üzerinde gerçekleştirir. Örneğin, 3 x 3 çekirdek, merkez piksel için yeni bir değer hesaplamak için pikseli çevreleyen sekiz komşusu (gri gölgeli) ile değerlendirir. Bu işlem, sekiz bitişik pikseli ile piksel piksel görüntü boyunca tekrarlanır. Programda analizi yapılacak resimdeki ilgi bölgesi (Region Of Interest/ROI) 4 farklı şekilde bulunur:

- 1) Kenar Algılama, unsurların kenarlarını arar. Bu yöntem, gradyan kenarlarını arar. Sınırdaki yoğunluk değişikliklerinin oranı, gradyan veya eğim değişimleri aranarak hesaplanır. Bulunan ROI'lerin sayısı, gradyan ayarıyla kontrol edilir (%0,1-%200). Bu değer, algoritma tarafından, yeni bir ROI nesnesi olarak tanımlanmadan önce kenarın ne kadar dik bir eğime sahip olması gerektiğini (kenar boyunca yoğunluk değişim oranı) belirlemek için kullanılır. Seçilen yüzde ne kadar yüksek olursa, aranan kenarlar o kadar keskin ve ROI o kadar yoğun olur.
- 2) Eşik, görüntü nesnelerini arka plandan ayırmak için önceden tanımlanmış bir sinyal eşik değeri kullanır. Bu yöntem, görüntünün iyi ayrılmış ve düzgün bir arka plana sahip nesneler (örneğin, nokta ve yuva lekeleri) içerdiğinde kullanışlıdır. Bu yöntemde, eşik değerinin üstündeki veya altındaki piksel grupları, birlikte ROI'ler olarak gruplanır. Bu teknik, arka plan yoğunluğunda büyük farklılıklar olan görüntüler için iyi çalışmayacaktır.
- 3) Yoğunluk Dilim, görüntüyü üç ayrı yoğunluk aralığına böler. Eşik tekniği gibi, bu teknik de görüntüdeki arka plan varyasyonlarına karşı hassastır. ROI'ler, orta aralıktaki piksel gruplarından oluşur. Bu teknik kullanarak, yalnızca daha açık veya daha koyu nesneleri bulmak ve analiz etmek için maksimum ve minimum sinyal değeri ayarlanabilir, örneğin mavi/beyaz koloni tahlillerini veya farklı boyalarla boyanmış jelleri saymak.
- 4) Zirve Bulucu, programda kullanılan diğer otomatik ROI buluculardan farklıdır, çünkü yoğunluğun zirveleri etrafında rastgele şekiller değil, oval veya dikdörtgen ROI'ler oluşturur. Zirve bulucu, diğer bulucuların tek olarak gruplayabileceği zirveleri ayırabilir. Ayrıca, tepe bulucu, görüntü arka planındaki değişikliklere diğer otomatik bulma ROI yöntemlerine göre çok daha az duyarlıdır. Örneğin koloni plakalarını veya plak tahlillerini sayıyorsanız, tepe bulucuyu en yararlı bulursunuz.

Yazılım, çoğu Windows uygulama programı gibi kolayca bilgisayarımıza yüklenebilir. Moleküler Görüntüleme Yazılımı CD'si CD sürücüsüne takılır ve yükleyiciyi başlatmak için Installer.exe simgesi çift tıklattılır. Yükleyici, yükleme işlemi boyunca sizi yönlendirir. Sistemin tam işlevselliğini sağlamak için yazılımı varsayılan dizine yüklemek için Tam Kurulum'u seçtiğinizden emin olmamız gerekir.

Carestream Moleküler Görüntüleme Yazılımı, verilerin doğruluğunu korumada önemli olan kayan nokta değerlerini kullanarak analizi gerçekleştirir. Kayan noktanın avantajı, matematiksel işlevler gerçekleştirilirken verilerin kesilmemesi veya kırılmamasıdır. Satır ve sütunlarda düzenli aralıklarla yerleştirilmiş yuvaları, noktaları, dizileri veya mikro plakaları analiz etmek için görüntüde ROI'ler oluşturularak ölçümler gerçekleştirilebilir. Dikdörtgenler veya elipsler içeren bir ızgara yapılabilir. Çizildikten sonra, bu ROI'ler düzenlenebilir, taşınabilir ve çoğaltılabilir. ROI'ler çizildikten sonra, ROI'nin merkeze (kütle merkezi veya yoğunluk dağılımının 2. momenti) göre konumu otomatik olarak ortalanması seçilebilir. ROI'ler standart olarak belirlenebilir ve

bilinmeyen ROI'leri ölçmek üzere bir kütle eğrisi oluşturmak için bu standartlar kullanılabilir. ROI Analizi Verileri penceresi, tüm ROI verilerini elektronik tablo biçiminde gösterir. ROI Çözümleme Verileri penceresinde hücreleri seçebilir, kopyalayabilir ve ardından bunları diğer programlara yapıştırabilir veya sekmeyle ayrılmış bir metin dosyasını dışa aktarabilirsiniz. Önceden ayarlanmış bir ızgara veya kendi ızgaranızı oluşturmayı seçebilirsiniz. Oluşturulduktan sonra, ızgaranızı ve ROI'leri döndürebilir, yeniden konumlandırabilir veya yeniden boyutlandırabilirsiniz. Benzer denemeleri düzenli olarak gerçekleştiriyorsanız, kılavuzu şablon olarak kaydedebilirsiniz. Bir görüntüye şablon uyguladığınızda, önceden tanımlanmış ROI'lerin tam bir kopyası uygulanır.



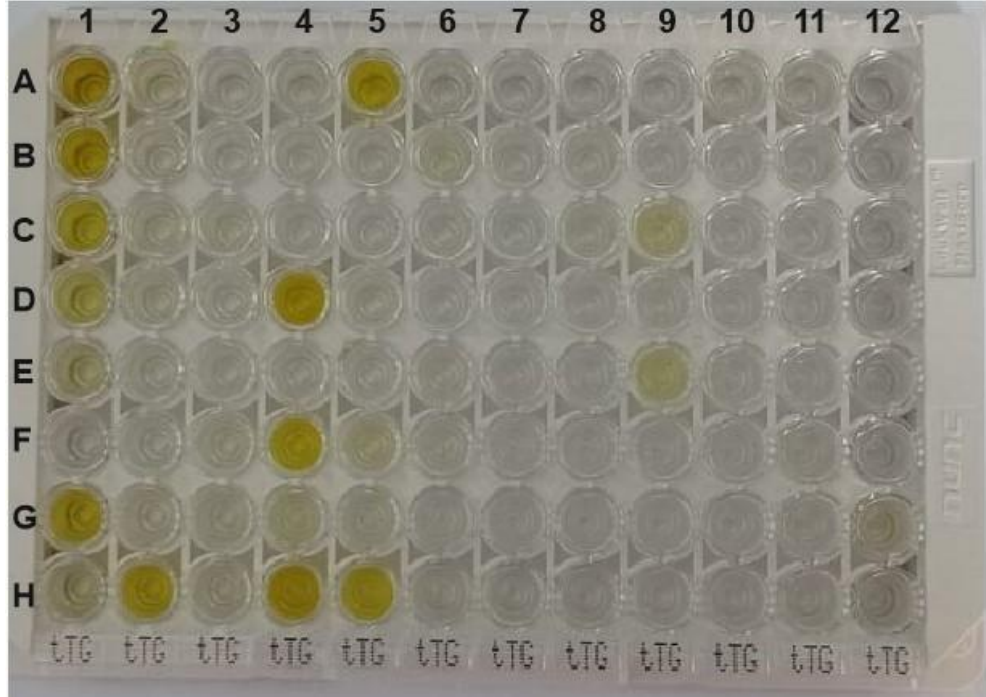
4. MATERYAL VE METOT

Çalışmamızda 96 kuyucuğa sahip Elisa plakasının verileri kullanılmıştır. Plakaların görüntüleri Dicle Üniversitesi Merkez Laboratuvarı Elisa Bölümünden temin edilmiştir. Plakaların içerisinde 8 adet kontrol ve kalibratör, 88 adet hasta numunesi bulunmaktadır ve görüntüsü Şekil 4.1.'da verilmiştir.

4.1. Klasik Yöntemle Analiz

Fotometrik ölçüm metodu yardımıyla Triturus marka Elisa analizörüne yerleştirilmiş olan plakanın her kuyucuğunun OD değeri tayin edilmiştir. Kalibratörler yardımıyla cihazın fotometrik kalibrasyonu yapıldıktan sonra pozitif ve negatif kontrollerle de numunelerin OD değerleri ile pozitif (hasta) ya da negatif (hasta değil) durumları değerlendirilmektedir.

Plakalara yüklenmiş olan numunelerde Çölyak Hastalığının var olup olmadığı araştırılmıştır. Glüten adı verilen bir madde çoğunlukla arpa, buğday ve çavdar gibi tahıllarda bulunmaktadır. Çölyak hastalığına sahip bireylerin bağışıklık sistemleri de, işte bu glütene karşı anormal bir yanıt vermektedirler. Çölyak hastalığının teşhisi için doku transglutaminaz IgA testi yapılmaktadır. IgA testi için Elisa yöntemi bir seçenektir. Şekil 4.1.'de analizi yapılacak olan 96 kuyucuklu Elisa plakasının işlenmemiş görüntüsü bulunmaktadır.



Şekil 4.1. Analizi yapılan 96-well plate örneği

Plaka üzerindeki A1-F1 arasındaki 6 kuyucuk kalibratör, G1 kuyucuğu pozitif kontrol ve H1 kuyucuğu negatif kontroldür. Geriye kalan 88 kuyucuk da ise hasta numuneleri bulunmaktadır. Her bir kuyucuğa ait Optik Dansite (OD) değerleri Tablo 4.1., Tablo 4.2. ve Tablo 4.3.'de gösterilmiştir.

Tablo 4.1. Numunelerin Optik Dansite (OD) değerleri-I

Kuyucuk No	OD Değeri	Kuyucuk No	OD Değeri	Kuyucuk No	OD Değeri	Kuyucuk No	OD Değeri
A1	2,862	A2	0,087	A3	0,057	A4	0,07
B1	2,053	B2	0,052	B3	0,046	B4	0,069
C1	1,13	C2	0,072	C3	0,116	C4	0,051
D1	0,501	D2	0,099	D3	0,068	D4	4,367
E1	0,246	E2	0,081	E3	0,065	E4	0,046
F1	0,023	F2	0,042	F3	0,117	F4	1,863
G1	1,483	G2	0,085	G3	0,094	G4	0,169
H1	0,156	H2	1,537	H3	0,092	H4	2,385

Tablo 4.2. Numunelerin Optik Dansite (OD) değerleri-II

Kuyucuk No	OD Değeri	Kuyucuk No	OD Değeri	Kuyucuk No	OD Değeri	Kuyucuk No	OD Değeri
A5	2,209	A6	0,052	A7	0,046	A8	0,05
B5	0,073	B6	0,159	B7	0,063	B8	0,067
C5	0,054	C6	0,083	C7	0,032	C8	0,096
D5	0,095	D6	0,04	D7	0,04	D8	0,059
E5	0,025	E6	0,088	E7	0,061	E8	0,028
F5	0,207	F6	0,078	F7	0,028	F8	0,032
G5	0,07	G6	0,057	G7	0,05	G8	0,044
H5	1,233	H6	0,054	H7	0,062	H8	0,041

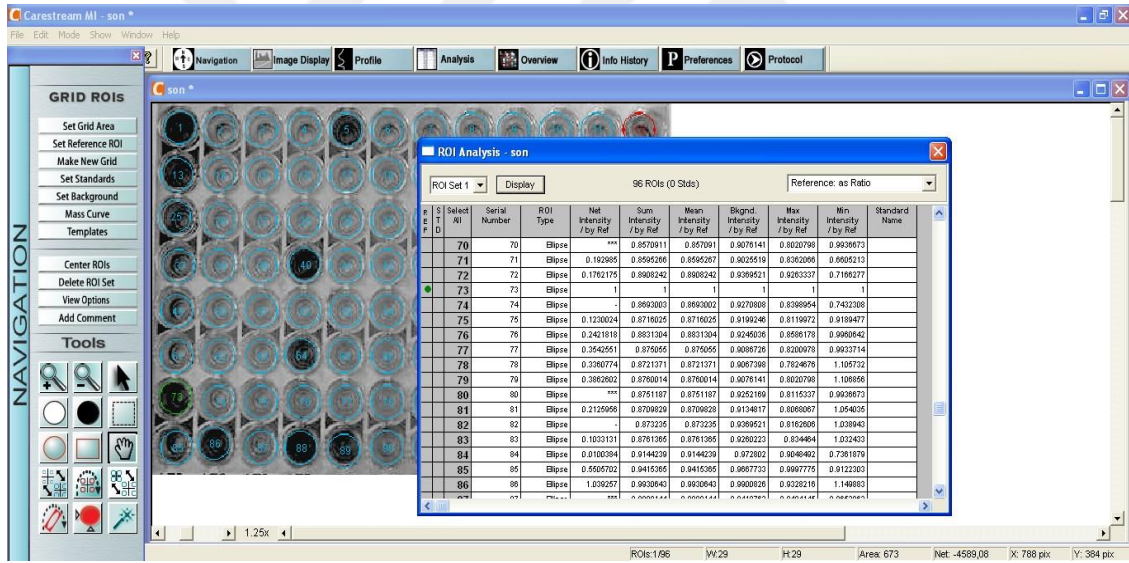
Tablo 4.3. Numunelerin Optik Dansite (OD) değerleri-III

Kuyucuk No	OD Değeri	Kuyucuk No	OD Değeri	Kuyucuk No	OD Değeri	Kuyucuk No	OD Değeri
A9	0,042	A10	0,092	A11	0,077	A12	0,045
B9	0,038	B10	0,04	B11	0,052	B12	0,046
C9	0,312	C10	0,037	C11	0,031	C12	0,055
D9	0,055	D10	0,046	D11	0,047	D12	0,067
E9	0,345	E10	0,035	E11	0,017	E12	0,022
F9	0,037	F10	0,039	F11	0,072	F12	0,034
G9	0,036	G10	0,04	G11	0,04	G12	0,146
H9	0,039	H10	0,04	H11	0,048	H12	0,061

4.2. Görüntü İşleme Programıyla Analiz

Elisa yöntemi aşamalarından geçen plakanın her bir kuyucuğunda oluşan renk değişimlerini hassas bir şekilde analiz edebilmek için öncelikle plakanın fotoğrafını mümkün olan en iyi kalitede çekip sistemimizde bulunan Carestream MI görüntü işleme programına yüklenmesi gerekmektedir. Program yardımıyla resmin parlaklık, bulanıklılık, kontrast gibi ayarlarını kolayca yapabilir. Ayrıca resim boyutlarını analiz öncesi istediğimiz ebatlara getirilir. Resmi gri-skala'ya dönüştürdükten sonra yoğunluk ölçümü yapılacak alan resim üzerinde belirlenip seçilir. Seçili bölgedeki kuyucukların boyutuna göre (kuyucukların her birinin görüntüsü elipse yakın) referans bir şekil oluşturulur. Şekil 4.2’de oluşturulan ve otomatik olarak çoğaltılabilen bu elipsleri, 96 kuyucuğun her birisinin üzerine 1 elips gelecek şekilde yerleştirilmesi ve program vasıtasıyla elipslerin altında kalan alanların her birisinin piksel sayısı, parlaklık, yoğunluk vb. değerleri gösterilmiştir.

Burada yapılan işlemler resmin piksel değerleriyle oynamak değil, gerekli işaretlemeler yapılarak hedef bölgelerin yoğunluklarının ölçülmesi işlemidir.



Şekil 4.2. Görüntü İşleme Programı Analiz Ekranı

Optik yoğunluk (OD), bir maddedeki madde miktarını sırasıyla ilettiği ışık miktarını ölçerek belirler ve şu şekilde ifade edilir:

$$\text{Optik Yoğunluk} = C \left(\log_{10} \frac{A-B}{I} \right) \quad (4.1)$$

Denklem 4.1’de;

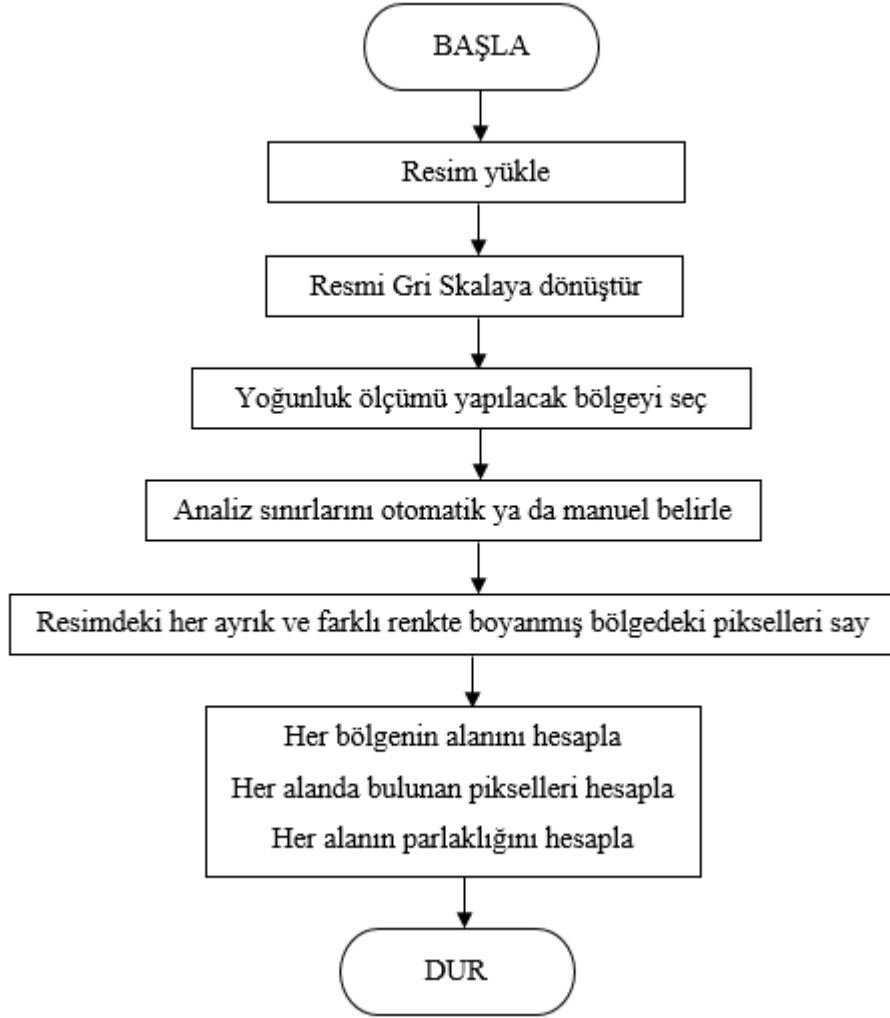
C = Belirli bir deneyde konsantrasyon değişimlerini eşitleyebilmek için kullanıcı tanımlı sabit (C’nin varsayılan durumu=1’dir).

A = Maksimum gözlemlenebilir yoğunluk (beyaz nokta).

B = Minimum gözlemlenebilir yoğunluk (siyah nokta).

I = Kaynak görüntüdeki her piksel için yoğunluk değeri.

Görüntü işleme programının genel işleyiş prosedürleri Şekil 4.3.'da detaylı bir şekilde verilmiştir.



Şekil 4.3. Görüntü işleme programı genel akış şeması

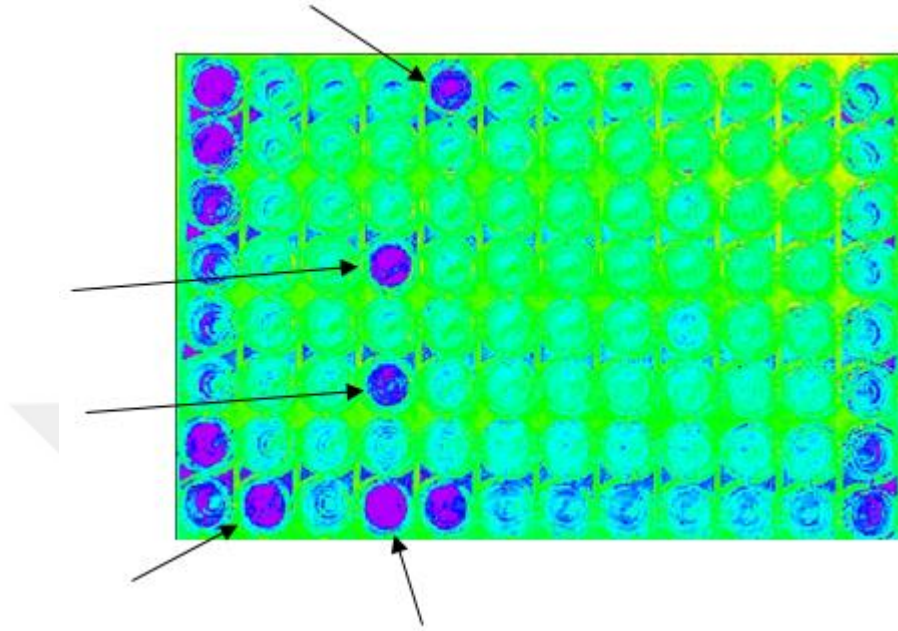
5. BULGULAR VE TARTIŞMA (ANALİZ)

Elisa plakasının üzerindeki kuyucukların her birindeki örnekler görüntü işleme tekniğiyle hassas bir şekilde okunabilir. Plakanın içerisindeki pozitif kontrol değerini (Tablo 5.1.'da 73 nolu kuyucuk) referans değer olarak alabiliriz. Değeri önceden belli olan bu kontrolün yoğunluk değerine göre diğer tüm numunelerin yoğunlukları kolayca hesaplanabilmektedir. Pozitif kontrolün altındaki değerler negatif (hasta değil), üzerindeki değerler pozitif (hasta) sonucunu vermektedir. İşaretli bölgelerin belirttiği alanların yoğunlukları Tablo 5.1.'da verilmiştir.

Tablo 5.1. Kuyucukların Yoğunluk (piksel sayısı) değerleri

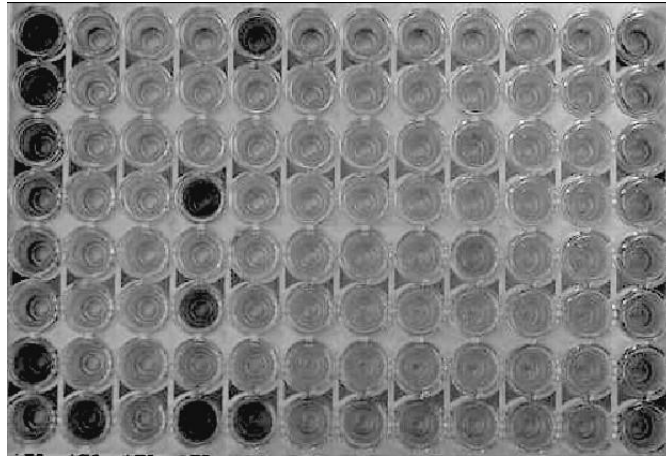
Kuyucuk No	Yoğunluk	Kuyucuk No	Yoğunluk	Kuyucuk No	Yoğunluk	Kuyucuk No	Yoğunluk
1	1,9819808	25	0,7802675	49	0,26986712	73	1
2	0,4135892	26	0,2889634	50	0,43195560	74	0,4490737
3	0,3919385	27	0,2651304	51	0,36303618	75	0,1230024
4	0,1430370	28	0,6576109	52	0,48199537	76	0,2421818
5	1,1511663	29	0,7089385	53	0,60018867	77	0,3542551
6	0,2511543	30	0,3182169	54	0,3107481	78	0,3360773
7	0,2794537	31	0,2857098	55	0,22128099	79	0,3862601
8	0,3114646	32	0,3801561	56	0,11330726	80	0,6083410
9	0,2005745	33	0,7820953	57	0,5515207	81	0,2125955
10	0,1137255	34	0,2028264	58	0,1068907	82	0,2002464
11	0,2595287	35	0,8226935	59	0,6171215	83	0,1033130
12	0,6198344	36	0,1828807	60	0,1458724	84	0,0100384
13	1,3737214	37	0,4261223	61	0,1555262	85	0,5505702
14	0,2449247	38	0,1575358	62	0,2215248	86	1,0392566
15	0,2545813	39	0,1069857	63	0,4052836	87	0,4938354
16	0,3668320	40	2,8082401	64	1,2860578	88	1,6046510
17	0,4378235	41	0,7143633	65	0,5610026	89	0,8104410
18	0,2197331	42	0,2363335	66	0,5234650	90	0,4276438
19	0,3283806	43	0,2474871	67	0,4305790	91	0,8459134
20	0,4180325	44	0,1677332	68	0,2139462	92	0,1946710
21	0,2780845	45	0,4138939	69	0,1551719	93	0,4773259
22	0,4523396	46	0,5099456	70	0,2863295	94	0,5841825
23	0,2982291	47	0,2189437	71	0,1929849	95	0,5081450
24	0,4482865	48	0,3113296	72	0,1762174	96	0,3719730

Şekil 5.1.'da program yardımıyla resmin gökkuşağı (rainbow) görüntü imajı seçilip renk skalasındaki minimum (mor), maksimum (kırmızı) ve gama ayarları düzenlenmiştir.



Şekil 5.1. Örnek rainbow renk paletli görüntü

Şekil 5.2.'da orijinal görüntü greyscale olarak gösterilmiştir. Parlaklık, kontrast ve gama ayarlamaları yapıldıktan sonra pozitif değerler netleştirilmiştir.



Şekil 5.2. Örnek greyscale görüntü

Şekil 4.1.'da A1, B1, C1, D1, E1, F1 kuyucukları; genellikle cihaz kalibrasyonu için kullanılan, değerleri bilinen ve büyük konsantrasyondan küçük konsantrasyona doğru gerileyen

değerler içermektedirler. G1 ve H1 kuyucuklarında bulunan solüsyonlar ise yine değerleri belli olan yüksek ve düşük kontrollerdir. Bu 8 adet solüsyonun Elisa cihazından alınan fotometrik sonuçlar ile görüntü analiz programından alınan yoğunluk değerleri arasında da benzer oranlar bulunmaktadır. Tablo 5.2’de vermiş olan karşılaştırmada, numune konsantrasyonunun yüksek olması (pozitif) durumunda her iki yöntemle bulunan sonuçlar arasında yaklaşık %5 - %10 arasında sapma olduğu gözlemlenmiştir.

Tablo 5.2. Kalibratör ve Kontrollerin OD / Yoğunluk Değerleri

Kalibratörler & Kontroller	OD Değeri	Yoğunluk (piksel sayısı)
Cal 1	2,862	1,9819808
Cal 2	2,053	1,3737214
Cal 3	1,13	0,7802675
Cal 4	0,501	0,4261223
Cal 5	0,246	0,26986712
Cal 6	0,023	0,1555262
Cont. (H)	1,483	1
Cont. (L)	0,156	0,2440595

6. SONUÇLAR

Görüntü işleme teknikleri kullanarak örnek resim üzerindeki kuyucuklardaki numunelerin sonuçları görsel olarak pozitif ya da negatif çıkması durumu kolaylıkla belirlenebilmektedir. Şekil 5.1'den de anlaşılacağı üzere OD değerleri pozitif kontrolden büyük olan numunelerin renkleri de elektromanyetik spektrumdaki mor alanda konumlanmaktadır. Bu yöntem kullanılarak numunelerin OD değerleri ile renk yoğunlukları arasında gözle görülür bir ilişki olduğu gözlemlenmektedir.

Görüntü işleme programı aracılığıyla Tablo 5.2'de bulunan kuyucuk yoğunluk değerleri ile Elisa cihazı OD değerleri arasında da sıkı bir ilişki olduğu görülmüştür. OD değeri 1,483 olan pozitif kontrolünü referans (yoğunluk = 1) olarak aldığımızda; diğer kuyucukların yoğunluk değerleri otomatik olarak hesaplanmaktadır. Çıkan sonuçlarda hangi kuyucuğun yoğunluk değeri 1'in üzerinde ise o numune pozitifdir diyebiliriz.

Program vasıtasıyla alınan görüntü yoğunluk değerlerinin her biri aslında birer referans değeridir. Fotometrik okuma sistemine sahip tüm cihazların; test sonuçlarını karşılaştırabilecekleri en az bir adet kontrolleri mevcuttur. Dolayısıyla kullandığımız bu program da elde etmiş olduğu piksel değerlerinin yoğunluklarını bizim belirlediğimiz herhangi bir kuyucuğu referans alarak belirlemektedir.

Çalışmamızda kullanılan örnek plakanın numune sonuçlarında 5 adet hasta (pozitif) olduğu bilinmekteydi. Görüntü analiz programı vasıtasıyla elde edilen yoğunluk değerleriyle de plakanın aynı kuyucuklarının pozitif olduğu gözlemlenmiştir.

Elisa okuyucu cihazlarının maliyetleri kullanmış olduğumuz Görüntü İşleme Programının maliyetine göre oldukça yüksektir. Programın herhangi bir bakımı ya da onarımı söz konusu olmadığı gibi programla ilgili bir sorunla karşılaşıldığı zaman sorunun ortadan kaldırılması çok kısa bir süre almaktadır. Laboratuvarında çalışan sorumlu kişilerin programı kendi yetileriyle bilgisayara kurmaları oldukça basittir.

Programın görüntü işleme teknikleri kullanarak çalışması sadece alınan görüntü ile gerçekleştiği için; elisa okuyucu cihazlarının arızalanması ya da bakım süreci içerisinde hastalara sonuç verilememesi durumunda zaman açısından oldukça kazançlı sayılırız. Cihazların çalışmadığı durumlarda numunelerin laboratuvar personeli tarafından mikropalakalara pipetlenmesi ve gerekli işlemlerin yapılmasının ardından plakanın resminin alınıp analiz işlemine hemen başlanabilmesi de hem zaman hem de süreklilik açısından oldukça önemlidir.

ÖNERİLER

Daha uygun şartlarda ve daha spesifik fotoğrafların alınması kaydıyla daha anlamlı ve daha doğru sonuçlar elde edilebilir. Genellikle Araştırma-Geliştirme laboratuvarlarında kullanılan ve Jel Görüntüleme Sistemleri olarak adlandırılan cihazlarla bu tür 96-well plate görüntüleri daha net alınabilmektedir. Bu sistemlerde bulunan karanlık oda, çeşitli filtre seçenekleri, Epi-UV, Trans-UV, Epi-white light ve Trans-white light ışık seçenekleri, gelişmiş ve sabit kamera ile örneklerin görüntüleri çok daha net alınabilmektedir. Dolayısıyla analizi yapılacak örnek resimlerin görüntülerinin net olması; alınacak yoğunluk değerlerinin de mevcut OD değerlerine o kadar yakın olması anlamına gelmektedir.

Gelişen mobil iletişim araçları sayesinde verilerimizin taşınması ve istenilen yerlerde kullanılması kolaylaşmıştır. Görüntü işleme programlarının mobil cihazlarda kullanılabilmesiyle; örneklerin cep telefonlarıyla resmedilip aynı zamanda analizlenmesi zaman ve pratiklik açısından ciddi faydalar sağlayacaktır.

Programın laboratuvar ortamında kullanılması; gerek renk değişimine gerekse fotometrik ölçüm tekniğine bağlı olarak görsel sonuçları veren hemen hemen tüm sistemlerde (DNA-RNA bant analizi, bakteri besiyeri koloni sayımı vb.) alternatif bir metot olarak kullanılabilir.

KAYNAKLAR

- [1] Santoso, K., Herowati, U. K., Lukman, D. W., Murtini, S., Rotinsulu, D. A., & Tarigan, R. (2022, February). Comparing Antibody Titers After Vaccination In Dogs Using Elisa Reader With Image Processing Techniques. In International Conference On Research and Development (Icorad) (Vol. 1, No. 1, Pp. 85-98).
- [2] Murdock, R. C., Shen, L., Griffin, D. K., Kelley-Loughnane, N., Papautsky, I., & Hagen, J. A. (2013). Optimization of a paper-based ELISA for a human performance biomarker. *Analytical chemistry*, 85(23), 11634-11642.
- [3] Soldat, D. J., Barak, P., & Lepore, B. J. (2009). Microscale Colorimetric Analysis Using a Desktop Scanner and Automated Digital Image Analysis. *Journal of Chemical Education*, 86(5), 617.
- [4] Türker, E., Dönmez, E. T., & Yaman, N. (2017). Tekstil Yüzeylerinde Oluşan Boncuklanmanın Görüntü İşleme İle Ölçülmesi. *İleri Teknoloji Bilimleri Dergisi*, 6(1), 50-61.
- [5] Hjortdal, J. Ø., & Jensen, P. K. (1995). In Vitro Measurement of Corneal Strain, Thickness, and Curvature Using Digital Image Processing. *Acta Ophthalmologica Scandinavica*, 73(1), 5-11.
- [6] Zanca, F., Jacobs, J., Van Ongeval, C., Claus, F., Celis, V., Geniets, C., ... & Bosmans, H. (2009). Evaluation of Clinical Image Processing Algorithms Used in Digital Mammography. *Medical Physics*, 36(3), 765-775.
- [7] Yaman, K., Sarucan A., Atak M., Aktürk N. (2001). Dinamik çizelgeleme için görüntü işleme ve arıma modelleri yardımıyla veri hazırlama, Gazi Üniv. Müh. Mim. Fak. Der. Cilt 16, No 1, 19-40
- [8] http://www.ibrahimcayiroglu.com/Dokumanlar/GoruntuIsleme/Goruntu_Isleme_Ders_Notlari-1.Hafta.pdf (Erişim Tarihi: 02.02.2021)
- [9] Haralick, R.M. ve Shapiro, L.G., (1993). *Computer and Robot Vision*, Addison Wesley Publishing Co., USA.
- [10] Baxes, A G., (1994). *Digital Image Processing Principles and Applications*, John Wiley & Sons, Inc., USA.
- [11] Gonzalez, R.C., Woods, R.E. (2002). *Digital Image Processing*, 3rd Edition, Prentice Hall.
- [12] Castelman, R. K., (1996). *Digital Image Processing*, Prentice hall, Englewood Cliffs, New Jersey, USA.
- [13] Yaman, K., (2000). Görüntü İşleme Yönteminin Ankara Hızlı Raylı Ulaşım Sistemi Güzergahında Sefer Aralıklarının Optimizasyonuna Yönelik Olarak İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [14] McAndrew, A. (2004). *An Introduction to Digital Image Processing with MATLAB*, Melbourne
- [15] The MathWorks Inc., (2015). *Image Processing Toolbox™ User's Guide*. 1-40.
- [16] Yıldız K., (2014) “Kumaş Hatalarının Isıl Görüntüleme ve Görüntü İşleme Teknikleri ile Tespit Edilmesi”, Yayınlanmamış Doktora Tezi, Marmara Üniversitesi, İstanbul.
- [17] Luhman, T., Robson, S. ve Kyle, S. (2011). *Close Range Photogrammetry Principles, Methods and Applications*.
- [18] Demirkaya, O., Asyali, M. H., & Sahoo, P. K. (2009). *Image processing with MATLAB: applications in medicine and biology*. CRC Press, 18-67.
- [19] Perihanoğlu, G.M. (2015). *Dijital görüntü işleme teknikleri kullanılarak görüntülerden detay çıkarımı*, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi, İstanbul.

- [20] Türker, E., Dönmez, E. T., & Yaman, N. (2017). Tekstil Yüzeylerinde Oluşan Boncuklanmanın Görüntü İşleme İle Ölçülmesi. İleri Teknoloji Bilimleri Dergisi, 6(1), 50-61.
- [21] Samtaş, G , Gülesin, M . (2012). Sayısal Görüntü İşleme ve Farklı Alanlardaki Uygulamaları . Ejovoc (Electronic Journal of Vocational Colleges) , 2 (1) , 85-97
- [22] Gonzalez R. C., Woods R. E. (2007). Digital Image Processing, 3th Ed., (pp. 1-7), A.B.D., New Jersey : Prentice Hall.
- [23] Jähne, B. (2005). Digital Image Processing, Springer, 6th Ed., (pp. 7-19), Berlin
- [24] Roitt I, Brostoff J, Male D: Immunological Techniques. In: Immunology, 5th edition, Mosby, London: 1998: 386.
- [25] <https://www.memorial.com.tr/tani-ve-testler/elisa-testi-nedir-nasil-yapilir> (2022)
- [26] Bilgehan H. Klinik Mikrobiyolojik Tanı, İkinci baskı. İzmir:Barış Yayınları Fakülteler Kitapevi, 1995: 224-8.
- [27] Coligan JE, Kruisbeek AM, Margulies DH, Shevach EM, Strober W. Antibody Detection and Preparation. In: Current Protocols in Immunology. Vol 1., New York: John Wiley & Sons, 1994: 2.1.1-2.1.4.)
- [28] <https://smacgigworld.com/blog/principle-and-applications-of-microplate-reader.php> (2022)
- [29] <https://microbiologynote.com/spectrophotometer-principle> (2022)

ÖZGEÇMİŞ

Muhittin AKSOY

Category	Value
Category 1	Value 1
Category 2	Value 2
Category 3	Value 3
Category 4	Value 4
Category 5	Value 5
Category 6	Value 6
Category 7	Value 7

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

■ [REDACTED]
 [REDACTED]
 [REDACTED]
 ■ [REDACTED]
 ■ [REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED])